

10/551929

DOCKET NO.: 279089US0PCT

JC20 Rec'd PCT/PTO 05 OCT 2005

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Frederic TARAN, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR04/50158

INTERNATIONAL FILING DATE: April 13, 2004

FOR: METHOD FOR SCREENING PROCESS CONDITIONS OF A CHEMICAL COUPLING REACTION AND KITS THEREFOR

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**  
**AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents  
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<b><u>COUNTRY</u></b>	<b><u>APPLICATION NO</u></b>	<b><u>DAY/MONTH/YEAR</u></b>
France	03 50106	15 April 2003

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR04/50158.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

Customer Number  
**22850**

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 08/03)



PCT/FR 2004/050158

15 AVR. 2004

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

REC'D 09 JUL 2004

WIPO

PCT

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 19 MARS 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



## BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITE

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: 15.04.2003 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: 75 035 0106 DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: 75 DATE DE DÉPÔT: 15.04.2003	Jean LEHU BREVATOME 3, rue du Docteur Lanceraux 75008 PARIS France
Vos références pour ce dossier: B14076.3/SL BD1417	

<b>1 NATURE DE LA DEMANDE</b>				
Demande de brevet				
<b>2 TITRE DE L'INVENTION</b>				
PROCÉDE DE CRIBLAGE DE CONDITIONS OPÉRATOIRES D'UNE REACTION CHIMIQUE DE COUPLAGE ET TROUSSES POUR LA MISE EN ŒUVRE DE CE PROCÉDE				
<b>3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE</b>		Pays ou organisation	Date	N°
<b>4-1 DEMANDEUR</b>				
Nom		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE		
Rue		31-33, rue de la Fédération		
Code postal et ville		75752 PARIS 15ème		
Pays		France		
Nationalité		France		
Forme juridique		Etablissement Public de Caractère Scientifique, technique et Ind		
<b>5A MANDATAIRE</b>				
Nom		LEHU		
Prénom		Jean		
Qualité		Liste spéciale: 422-5 S/002, Pouvoir général: 7068		
Cabinet ou Société		BREVATOME		
Rue		3, rue du Docteur Lanceraux		
Code postal et ville		75008 PARIS		
N° de téléphone		01 53 83 94 00		
N° de télécopie		01 45 63 83 33		
Courrier électronique		brevets.patents@brevalex.com		
<b>6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS</b>				
Fichier électronique		Pages		Détails
Texte du brevet		textebrevet.pdf		64
Dessins		dessins.pdf		3
Pouvoir général				D 49, R 14, AB 1 page 3, figures 4

7 MODE DE PAIEMENT					
Mode de paiement		Prélèvement du compte courant			
Numéro du compte client		024			
8 RAPPORT DE RECHERCHE					
Etablissement immédiat					
9 REDEVANCES JOINTES		Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
062 Dépôt		EURO	0.00	1.00	0.00
063 Rapport de recherche (R.R.)		EURO	320.00	1.00	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème		EURO	15.00	16.00	240.00
Total à acquitter		EURO			560.00

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

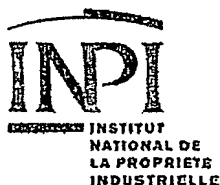
Signé par

Signataire: FR, Brevatome, J.Lehu

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)



## BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

### Réception électronique de la soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou de certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été attribués automatiquement.

Demande de brevet: X

Demande de CU:

<b>DATE DE RECEPTION</b>	15 avril 2003	
<b>TYPE DE DEPOT</b>	INPI (PARIS) - Dépôt électronique	Dépôt en ligne: X
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI</b>	0350106	Dépôt sur support CD:
<b>Vos références pour ce dossier</b>	B14076.3/SL BD1417	

#### DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale	COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
Nombre de demandeur	1
Pays	FR

#### TITRE DE L'INVENTION

PROCEDE DE CRIBLAGE DE CONDITIONS OPERATOIRES D'UNE REACTION CHIMIQUE DE COUPLAGE ET TROUSSES POUR LA MISE EN ŒUVRE DE CE PROCEDE

#### DOCUMENTS ENVOYES

pkgheader.xml	Requetefr.PDF	fee-sheet.xml
package-data.xml	ValidLog.PDF	textebrevet.pdf
FR-office-specific-info.xml	application-body.xml	request.xml
dessins.pdf	indication-bio-deposit.xml	

#### EFFECTUE PAR

Effectué par:	J.Lehu
Date et heure de réception électronique:	15 avril 2003 11:40:17
Empreinte officielle du dépôt	F7:E8:55:46:81:DE:7F:FC:18:2E:1E:24:9C:3F:BA:35:31:91:7F:0D

/ PARIS, Section Dépôt /

SIEGE SOCIAL  
INSTITUT 26 bis, rue de Saint Petersbourg  
NATIONAL DE 75800 PARIS cedex 08  
LA PROPRIETE Téléphone : 01 53 04 53 04  
INDUSTRIELLE Télécopie : 01 42 93 59 30

PROCEDE DE CRIBLAGE DE CONDITIONS OPERATOIRES D'UNE  
REACTION CHIMIQUE DE COUPLAGE ET TROUSSES POUR LA MISE  
EN ŒUVRE DE CE PROCEDE

5

## DESCRIPTION

## DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention se rapporte à un  
procédé de criblage de conditions opératoires d'une  
réaction chimique de couplage, ainsi qu'à des trousse  
10 propres à permettre la mise en œuvre de ce procédé.

De façon plus précise, elle se rapporte à  
un procédé permettant de tester simultanément les  
effets de différentes conditions opératoires sur le  
rendement d'une réaction consistant à coupler au moins  
15 deux groupements fonctionnels en vue, par exemple, de  
sélectionner celle ou celles de ces conditions qui  
conduisent à une optimisation de ce rendement.

Ces conditions opératoires peuvent être  
aussi bien qualitatives que quantitatives.

20 Ainsi, le procédé peut servir à cribler des  
substances, comme des catalyseurs ou des solvants, dont  
on souhaite savoir si elles sont susceptibles de  
présenter une utilité dans une réaction de couplage  
particulière, mais il peut également être employé pour  
25 cribler des niveaux, par exemple de température ou de  
pression, des concentrations, des rapports stœchio-  
métriques ou des durées comme la durée de réaction ou  
la durée d'agitation du milieu réactionnel, dont on  
souhaite connaître l'influence sur le rendement d'une  
30 réaction de couplage.

Le procédé selon l'invention est donc susceptible de trouver de très nombreuses applications dans le domaine de la recherche, tant fondamentale qu'appliquée.

5                   Ainsi, par exemple, il peut être utilisé dans des études fondamentales visant à une meilleure compréhension des mécanismes de la catalyse homogène ou hétérogène et ce, qu'elle soit chimique ou biologique.

10                   Il peut également être utilisé dans des études de recherche appliquée, en particulier dans les secteurs de la chimie, de l'agroalimentaire, de la pharmacie et de la protection de l'environnement, ayant pour objectif, soit de développer des catalyseurs plus performants ou plus aptes à répondre spécifiquement à  
15 des contraintes particulières, soit d'optimiser les rendements de réactions de synthèse ou les conditions expérimentales, en vue par exemple d'abaisser les coûts de mise en œuvre de ces réactions.

20                   Notamment, il peut servir à cribler une banque d'enzymes mutées afin d'améliorer les performances catalytiques d'une enzyme "sauvage", ou à cribler des milieux biologiques de composition connue ou inconnue dans le but d'identifier l'existence d'une activité catalytique particulière dans ces milieux.

25

#### **ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE**

En matière de criblage de conditions opératoires d'une réaction de couplage, ce sont essentiellement des procédés destinés à cribler des  
30 catalyseurs qui ont été proposés jusqu'à présent.

Ces procédés comprennent tous une étape consistant à faire réagir deux composés particuliers, représentatifs des familles de composés pour lesquelles la réaction de couplage est susceptible d'être  
5 utilisée, en présence des différents catalyseurs candidats, suivie d'une étape consistant à apprécier l'efficacité de ces catalyseurs sur ladite réaction.

Ainsi, on connaît, en premier lieu, des procédés qui visent à analyser, à l'issue de la  
10 réaction de couplage, la composition des milieux réactionnels par chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC), ce qui implique qu'il faut d'abord les purifier, par exemple par filtration sur des colonnes de gel de silice.

15 Il s'agit donc de procédés lourds à mettre en œuvre, qui ne permettent d'effectuer qu'un nombre limité de tests par jour et qui sont, par conséquent, totalement inadaptés à un criblage à moyen ou haut débit.

20 Il existe, en second lieu, des procédés qui visent à employer, à l'issue de la réaction de couplage, un réactif chimique qui est capable de réagir, soit avec l'un des composés engagés dans cette réaction de couplage, soit avec le produit ou un sous-  
25 produit issu de ladite réaction, en générant un signal comme une coloration, une décoloration, l'émission d'une fluorescence ou d'une chimio-luminescence.

A titre d'exemples, on peut citer :

30 - le procédé décrit par Lavastre et Morken dans *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38(21), 3163-3165, [1], pour le criblage de catalyseurs utiles dans une



alkylation allylique et qui prévoit de détecter le 1-naphtol produit au cours de cette alkylation en le faisant réagir avec le sel de diazonium connu sous le nom de "Fast Red Violet LB", pour le faire virer à l'orange vif ;

- celui décrit par Böhm et Herrmann dans *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, 3679-3681, [2], pour le criblage de catalyseurs utiles dans la réaction de Sonogashira et qui consiste à révéler le produit de cette réaction en l'oxydant par du  $\text{KMnO}_4$ , ce qui provoque une décoloration des milieux réactionnels ; et

- celui proposé par Löber et al. dans *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 4366-4367, [3], pour le criblage de catalyseurs utiles dans l'hydroamination de 1,3-diènes par des arylamines comme l'aniline, et qui consiste à révéler l'aniline résiduelle en la faisant réagir avec du furfural en présence d'un acide, ce qui a pour effet de colorer en rouge les milieux réactionnels.

Ce second type de procédés présente, lui, l'inconvénient de nécessiter des réactifs spécifiques de l'un des composés engagés dans la réaction de couplage ou du produit formé par cette réaction, ce qui limite son utilisation au criblage de réactions mettant en jeu des composés ou aboutissant à des produits pour lesquels de tels réactifs sont disponibles.

Il existe, encore, des procédés dans lesquels l'un des composés engagés dans la réaction de couplage est fixé sur un support solide, tandis que l'autre est marqué par une sonde fluorescente. Les deux composés étant mis à réagir, l'efficacité de la

catalyse se traduit par la formation sur le support solide du produit issu de la réaction. Il convient alors de laver ce support pour éliminer la fraction des composés n'ayant pas réagi et de détecter le produit  
5 issu de la réaction par lecture de la fluorescence présente sur ledit support.

Un exemple de ces procédés est illustré dans l'article de Shaugnessy et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 2123-2132, [4]) pour le criblage de  
10 catalyseurs utiles dans la réaction de Heck. Dans cet exemple, le premier composé est un halogénure d'aryle qui est fixé sur une résine de polystyrène réticulé (résine de Wang), tandis que le second composé est un acrylate marqué par de la coumarine.

15 Ce dernier type de procédés présente deux inconvénients majeurs. Tout d'abord, la catalyse est réalisée en milieu hétérogène. Or, on sait qu'un catalyseur qui manifeste une haute activité catalytique en milieu hétérogène peut parfaitement se révéler  
20 inefficace en milieu homogène. Par ailleurs, l'appréciation de la catalyse est essentiellement qualitative, dans la mesure où il est difficile de calculer le rendement de la réaction de couplage puisque ce calcul nécessiterait de connaître le taux de  
25 greffage du premier composé sur le support solide.

Un autre type encore de procédés est basé sur le fait qu'en présence d'un catalyseur efficace, le dégagement de chaleur d'une réaction s'effectue plus rapidement qu'en présence d'un catalyseur inefficace.  
30 Ainsi, il est possible d'apprécier l'efficacité de catalyseurs en mesurant la variation de température des

milieux réactionnels, soit par calorimétrie, soit par thermographie au moyen de caméras à infrarouges ultrasensibles fixées au-dessus desdits milieux réactionnels.

5 Un exemple de mise en œuvre de ce type de procédés est illustré dans la publication de Blackmond et al. (*Organic Process Research & Development*, 1999, 3(4), 275-280, [5]) pour le criblage de catalyseurs utiles dans la réaction de Heck.

10 Les procédés de criblage par analyse thermique ont le défaut de nécessiter un matériel lourd et onéreux. Par ailleurs, ils ne permettent pas un calcul du rendement réactionnel. Enfin, ils ne sont pas applicables à des réactions qui se déroulent lentement  
15 et qui, de ce fait, dégagent des quantités de chaleur qui ne sont pas détectables ou suffisamment significatives.

Enfin, il a été proposé par Hinderling et Chen dans *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38(15), 2253-  
20 2256, [6], d'utiliser la spectrophotométrie de masse couplée à l'électropulvérisation pour effectuer le criblage de catalyseurs de polymérisation d'oléfines. Là également, il s'agit d'un procédé qui requiert un appareillage lourd et coûteux.

25 Il existe donc un réel besoin de disposer d'un procédé qui permette de tester les effets de différentes conditions opératoires sur une réaction de couplage et, plus particulièrement, l'utilité potentielle de catalyseurs dans cette réaction, et qui,  
30 d'une manière générale, soit exempt de tous les

inconvenients présentés par les procédés de criblage proposés jusqu'à présent.

#### EXPOSÉ DE L'INVENTION

- 5                    La présente invention répond précisément à ce besoin en fournissant un procédé de criblage de conditions opératoires d'une réaction de couplage d'au moins deux groupements fonctionnels, qui comprend les étapes suivantes :
- 10                    i) faire réagir ensemble au moins deux composés :
- un premier composé de formule  $E_1-X_1-G_1$  dans laquelle  $G_1$  représente un premier desdits au moins deux groupements fonctionnels,  $X_1$  représente une liaison covalente ou un premier groupe espaceur, tandis que  $E_1$  15 représente le reste d'une première molécule  $M_1$  pour laquelle on dispose d'un premier anticorps  $AC_1$  spécifique, et
  - un deuxième composé de formule  $E_2-X_2-G_2$  dans 20 laquelle  $G_2$  représente un deuxième desdits au moins deux groupements fonctionnels,  $X_2$  représente une liaison covalente ou un deuxième groupe espaceur, identique ou différent de  $X_1$ , tandis que  $E_2$  représente, soit le reste d'une deuxième molécule  $M_2$  différente de 25  $M_1$  et pour laquelle on dispose d'un deuxième anticorps  $AC_2$  spécifique, soit un groupe apte à former au moins une liaison covalente avec l'anticorps  $AC_1$  en présence d'un agent de couplage ;
- 30                    lesdits au moins deux composés étant mis à réagir en solution dans un solvant et dans des conditions opératoires prédéterminées dont l'une au moins est une

condition opératoire candidate, pour obtenir un milieu réactionnel et la formation dans ce milieu d'un composé Z comprenant l'enchaînement  $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$  dans lequel  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $E_1$  et  $E_2$  ont la même signification que précédemment, tandis que  $G_1-G_2$  représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits au moins deux groupements fonctionnels ;

ii) déterminer la concentration en composé Z du milieu réactionnel à un temps  $t$  de réaction prédéterminé, par au moins un dosage immunologique utilisant au moins l'anticorps  $AC_1$  ; et

iii) évaluer les effets de la ou des conditions opératoires candidates sur ladite réaction de couplage à l'aide de la concentration en composé Z ainsi déterminée.

Ainsi, dans le procédé selon l'invention, la réaction de couplage, dont on veut cribler les conditions opératoires et qui met en jeu au minimum deux groupements fonctionnels, en l'espèce  $G_1$  et  $G_2$ , est réalisée en utilisant comme réactifs, au moins deux composés qui comportent chacun, à une extrémité, l'un de ces groupements fonctionnels et, à l'autre extrémité, le reste d'une molécule, respectivement  $M_1$  et  $M_2$ , pour laquelle on dispose d'un anticorps spécifique, respectivement  $AC_1$  et  $AC_2$ , ou, dans le cas du deuxième composé, un groupe apte à former une ou plusieurs liaisons covalentes avec l'anticorps  $AC_1$  spécifique de la molécule  $M_1$  en présence d'un agent de couplage.

La concentration du milieu réactionnel en composé Z produit par la réaction de couplage peut

ainsi être aisément déterminée, à un temps  $t$  de réaction choisi, par au moins un dosage immunologique, ce dosage utilisant, soit uniquement l'anticorps  $AC_1$ , soit les deux anticorps  $AC_1$  et  $AC_2$ .

5                    Une fois la concentration en composé  $Z$  connue, il est alors possible de déterminer par un calcul le rendement de la réaction de couplage et d'apprécier les effets des conditions opératoires dans lesquelles elle a été réalisée par la valeur de ce  
10 rendement. Ces effets peuvent, toutefois, être également appréciés en comparant ladite concentration à une ou plusieurs concentrations préalablement obtenues dans des conditions opératoires différentes et servant de valeurs de référence.

15                    Dans ce qui précède et ce qui suit, on entend :

- par "condition opératoire candidate", une condition opératoire dont on teste les effets sur la réaction de couplage ;
- 20                    - par "reste" d'une molécule  $M_1$ , la partie de cette molécule qui subsiste dans le composé de formule  $E_1-X_1-G_1$  lorsque ladite molécule est liée de façon covalente, soit au groupement fonctionnel  $G_1$ , soit au groupe espaceur, selon que  $X_1$  représente une  
25 liaison covalente ou un groupe espaceur ; de manière similaire, le "reste" d'une molécule respectivement  $M_2$ ,  $M_3$  ou  $M_4$  correspond à la partie de cette molécule qui subsiste dans le composé respectivement de formule  $E_2-X_2-G_2$ ,  $E_3-X_3-G_3$  ou  $E_4-X_4-G_4$  lorsque ladite molécule est  
30 liée de façon covalente, soit au groupement fonctionnel respectivement  $G_2$ ,  $G_3$  ou  $G_4$ , soit au groupe espaceur

selon que  $X_2$ ,  $X_3$  ou  $X_4$  représente une liaison covalente ou un groupe espaceur.

Par ailleurs, on entend par "anticorps spécifique" d'une molécule, un anticorps apte à  
5 reconnaître spécifiquement cette molécule et à se lier avec elle par une réaction immunologique antigène-anticorps.

Comme précédemment indiqué, dans les composés  $E_1-X_1-G_1$  et  $E_2-X_2-G_2$ ,  $G_1$  et  $G_2$  correspondent aux  
10 deux groupements fonctionnels qui sont au minimum engagés dans la réaction de couplage dont on veut cribler les conditions opératoires et sont donc choisis en fonction de cette réaction.

Des réactions de couplage impliquant deux  
15 groupements fonctionnels et pour lesquelles le procédé selon l'invention est susceptible d'être utilisé sont notamment les réactions de couplage intermoléculaires suivantes :

- les réactions d'estérification telles que  
20 celles qui consistent à coupler un acide carboxylique ( $R-COOH$ ) ou un dérivé d'acide carboxylique comme, par exemple, un halogénure d'acide ( $R-CO-Hal$ ), et un alcool ( $R'-OH$ ) pour obtenir un groupe ester ( $R-CO_2R'$ ) ;

- les réactions d'amidification telles que  
25 celles qui consistent à coupler un acide carboxylique ( $R-COOH$ ) ou un dérivé d'acide carboxylique et une amine primaire ( $R'-NH_2$ ) ou secondaire ( $R'-NH-R''$ ) pour obtenir un amide ( $R-CONH-R'$  ou  $R-CONR'-R''$ ) ;

- les réactions d'aldolisation telles que  
30 celles qui consistent à coupler deux aldéhydes ( $R-CHO$ ) ou deux cétones ( $R-CO-R'$ ), ou à coupler un aldéhyde et

une cétone pour obtenir un aldol ou un cétole, et leurs variantes comme la réaction de nitro-aldolisation dans laquelle un aldéhyde est couplé à un composé nitré ( $R'-CH_2-NO_2$ ) pour obtenir un nitro-alcool ( $R-CH(OH)-CH(NO_2)-R'$ ) ;

- la réaction de Heck qui consiste à coupler une oléfine ( $R'-CH=CH_2$ ) et un halogénure organique ( $R'-Hal$ ) pour obtenir un alcène ( $R-CH=CH-R'$ ), et ses variantes ;

- la réaction de Baylis-Hillman qui consiste à coupler un alcène ( $R-CH=CH_2$ ) et un aldéhyde ( $R'-CHO$ ) pour obtenir un alcool allylique ( $R'-C(CH_2)-CH(OH)-R'$ ), et ses variantes ;

- la réaction de Michael qui consiste en une addition entre un composé nucléophile et un composé insaturé accepteur d'électrons (par exemple,  $R-CH=CH_2$ ), et ses variantes ;

- les réactions de métathèse comme celles qui consistent à coupler deux oléfines (par exemple,  $R-CH=CH_2$  et  $R'-CH=CH_2$ ) pour en obtenir une troisième ( $R-CH=CH-R'$ ) ;

- la réaction de Diels-Alder qui consiste en une cycloaddition entre un diène et un diénophile ;

- la réaction de Sonogashira qui consiste à coupler un alcyne ( $R-C\equiv CH$ ) et un halogénure d'aryle ( $Ar-Hal$ ) pour obtenir un arylalcyne ( $R-C\equiv C-Ar$ ), et ses variantes ;

- la réaction de Suzuki qui consiste à coupler un acide arylboronique ( $Ar-B(OH)_2$ ) et un



halogénure d'aryle ( $\text{Ar}'\text{-Hal}$ ) pour obtenir un diaryle ( $\text{Ar-Ar}'$ ), et ses variantes ;

- la réaction de Kumada qui consiste à coupler un réactif de Grignard ( $\text{R-Mg-Hal}$ ) et un halogénure d'alkyle, de vinyle ou d'aryle, et ses variantes ;

- la réaction de Stille qui consiste à coupler un composé organostannique (par exemple,  $\text{Ar-SnBu}_3$ ) et un halogénure organique (par exemple,  $\text{Ar}'\text{-Br}$ ), et ses variantes ;

- la réaction de Hiyama qui consiste à coupler un organosilane (par exemple,  $\text{Ar-SiR}_3$ ) et un halogénure organique (par exemple,  $\text{Ar}'\text{-Br}$ ), et ses variantes ; et

- la réaction de Liebeskind-Srogl qui consiste à coupler un acide boronique (par exemple,  $\text{Ar-B(OH)}_2$ ) et un thiolester ( $\text{R-CO-S-R}'$ ) pour obtenir une cétone, et ses variantes.

Des réactions de couplage impliquant trois groupements fonctionnels sont notamment la réaction de Mannich qui consiste à coupler un composé ayant un hydrogène actif avec un aldéhyde non énolisable et une amine primaire ou secondaire pour obtenir un composé aminométhylé, la réaction de Hantzsch qui consiste à coupler une amine avec un aldéhyde et une  $\alpha$ -bromo cétone pour obtenir un pyrrole, et la réaction de Bossio et al. qui consiste à coupler un  $\alpha$ -cétoaldéhyde avec un acide carboxylique et un iso-nitrile pour obtenir une oxazole, tandis qu'une réaction de couplage impliquant quatre groupements fonctionnels est, par

exemple, la réaction de Ugi qui consiste à coupler un acide carboxylique, une amine primaire, un composé carbonylé et un isocyanure pour obtenir un composé  $\alpha$ -aminocarboxamide.

5 Par ailleurs, dans les composés de formules  $E_1-X_1-G_1$  et  $E_2-X_2-G_2$ ,  $E_1$  représente le reste d'une molécule  $M_1$  pour laquelle on dispose d'un premier anticorps spécifique  $AC_1$ , tandis que  $E_2$  peut représenter le reste d'une molécule  $M_2$  pour laquelle on dispose  
10 d'un deuxième anticorps spécifique  $AC_2$ .

Ces deux restes doivent présenter des propriétés antigéniques analogues à celles des molécules  $M_1$  et  $M_2$  dont ils sont issus, de manière à être reconnus respectivement par l'anticorps  $AC_1$  et par  
15 l'anticorps  $AC_2$ , et à former avec eux une liaison immunologique, mais ils ne doivent ni gêner le déroulement de la réaction de couplage, notamment par un encombrement stérique, ni interférer dans cette réaction.

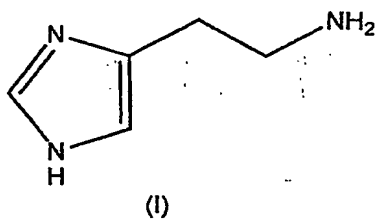
20 Aussi, les molécules  $M_1$  et  $M_2$  sont-elles, de préférence, des haptènes, c'est-à-dire des petites molécules qui, après greffage sur un vecteur tel qu'une protéine (sérum albumine bovine,  $\gamma$ -immunoglobuline, ...) ou un polysaccharide, sont aptes à induire chez  
25 l'animal la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre elles.

Ces haptènes peuvent notamment être des hydrocarbures comme le naphthalène, l'anthracène, le phénanthrène, le bicyclo[2.2.2]octane, le bicyclo-  
30 [2.2.2]heptane, le 2,2-diméthyl-3-méthyl-4,4-diméthylpentane, l'adamantane, le perhydrophénalène et le

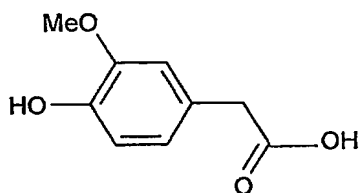
perhydroanthracène, substitués par une fonction réactive, de préférence acide carboxylique, amine ou thiol, propre à permettre, d'une part, de les greffer sur le vecteur et, d'autre part, de les lier aux groupements fonctionnels  $G_1$  et  $G_2$  ou aux groupes espaceurs dans le cas où  $X_1$  et  $X_2$  représentent de tels groupes. De tels hydrocarbures présentent, en effet, l'avantage d'être relativement inertes sur le plan chimique.

Toutefois, ces haptènes peuvent également être des molécules autres que des hydrocarbures auquel cas si, dans les composés  $E_1-X_1-G_1$  et  $E_2-X_2-G_2$ , les restes de ces molécules comportent un ou plusieurs groupes fonctionnels libres susceptibles de réagir aux conditions opératoires dans lesquelles est réalisée la réaction de couplage, il convient que ce ou ces groupes fonctionnels soient protégés par un groupe protecteur convenablement choisi avant de procéder à la réaction de couplage, c'est-à-dire préalablement à l'étape i) du procédé, puis déprotégés entre les étapes i) et ii).

Deux molécules se sont révélées constituer des haptènes particulièrement intéressants pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention. Il s'agit, d'une part, de l'histamine qui répond à la formule (I) ci-après :



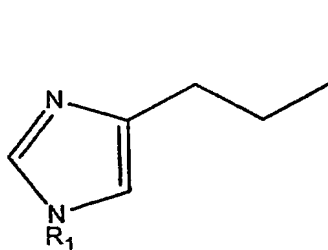
et pour laquelle il a été possible d'obtenir plusieurs anticorps monoclonaux présentant un  $K_d$  au moins égal à  $10^{-8}$  M, et, d'autre part, de l'acide homovanillique qui répond à la formule (II) ci-après :



(II)

et pour lequel il a été possible d'obtenir plusieurs anticorps monoclonaux présentant un  $K_d$  au moins égal à  $10^{-6}$  M.

Aussi, selon une première disposition préférée du procédé selon l'invention,  $E_1$  dans le composé  $E_1-X_1-G_1$  ou  $E_2$  dans le composé  $E_2-X_2-G_2$  répond-t-il à la formule (III) ci-après :

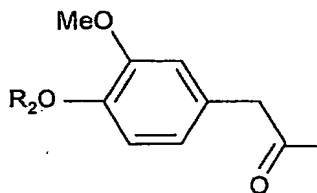


(III)

dans laquelle  $R_1$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe protecteur d'une fonction amine comme, par exemple, un groupe *tert*-butyloxycarboxyle (BOC) ou un groupe benzyle.

Selon une autre disposition préférée du procédé selon l'invention,  $E_1$  dans le composé  $E_1-X_1-G_1$

ou  $E_2$  dans le composé  $E_2-X_2-G_2$  répond à la formule (IV) ci-après :



(IV)

5 dans laquelle  $R_2$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe protecteur d'une fonction alcool comme, par exemple, un groupe silylé du type diméthyl tert-butylsilyle, le dihydropyrane ou encore un groupe benzyle, allyle ou acétal.

10 Dans le composé  $E_2-X_2-G_2$ ,  $E_2$  peut ne pas représenter le reste d'une molécule  $M_2$ , mais un groupe apte à former au moins une liaison covalente avec l'anticorps  $AC_1$  en présence d'un agent de couplage, auquel cas ce groupe est avantageusement choisi parmi  
15 les groupes amine, acide carboxylique, aldéhyde, thiol, phénol, alkényle, azoture et les groupes photo-activables comme, par exemple, les groupes benzophénone et arylazide.

20 De préférence,  $E_2$  est un groupe amine ou thiol.

Comme précédemment indiqué, dans les composés  $E_1-X_1-G_1$  et  $E_2-X_2-G_2$ ,  $E_1$  et  $E_2$  peuvent être liés aux groupements fonctionnels  $G_1$  et  $G_2$ , soit directement, soit par l'intermédiaire de groupes espaceurs.

25 Ces groupes espaceurs, qui n'ont, pour seule fonction, que celle de former un pont entre, d'une part,  $E_1$  et le groupement fonctionnel  $G_1$  et,

d'autre part, entre  $E_2$  et le groupement fonctionnel  $G_2$ , sont, soit des groupes dénués de tout groupement fonctionnel comme des groupes hydrocarbonés saturés du type éthylène  $-(CH_2)_2-$ , propylène  $-(CH_2)_3-$ , butylène  $-(CH_2)_4-$  ou analogues, soit des groupes comportant un ou plusieurs groupements fonctionnels inaptes à réagir aux conditions opératoires dans lesquelles est réalisée la réaction de couplage, soit encore des groupes comportant un ou plusieurs groupements fonctionnels que l'on protège, préalablement à la réalisation de la réaction de couplage, par un groupement protecteur approprié.

Conformément à l'invention, ledit au moins un dosage immunologique du composé  $Z$  est, de préférence, un dosage en phase solide pour des raisons de simplicité de mise en œuvre.

Selon un premier mode de mise en œuvre préféré du procédé selon l'invention,  $E_2$  correspondant, dans le composé  $E_2-X_2-G_2$ , au reste d'une molécule  $M_2$ , ledit au moins un dosage immunologique du composé  $Z$  est un dosage de type "sandwich" (ou à deux sites) et l'étape ii) comprend les étapes suivantes :

a<sub>1</sub>) mettre le milieu réactionnel obtenu au temps  $t$  de réaction en contact avec une phase solide sur laquelle est immobilisé l'anticorps  $AC_1$ , pour obtenir la fixation du composé  $Z$  sur cette phase solide par liaison immunologique entre cet anticorps et le reste  $E_1$  de ce composé ;

b<sub>1</sub>) mettre la phase solide en contact avec un conjugué comprenant l'anticorps  $AC_2$  couplé à un marqueur, pour obtenir la fixation de ce conjugué sur

cette phase solide par liaison immunologique entre cet anticorps et le reste  $E_2$  du composé Z fixé sur ladite phase solide ;

5             $c_1$ ) mesurer la quantité de conjugué fixé sur la phase solide à l'aide du marqueur couplé à l'anticorps  $AC_2$  ; et

$d_1$ ) déterminer sur une gamme d'étalonnage la concentration en composé Z du milieu réactionnel audit temps  $t$  à partir de la quantité de conjugué ainsi  
10            mesurée ;

ladite étape ii) comprenant, de plus, une ou plusieurs opérations de lavage de la phase solide entre les étapes  $a_1$ ) et  $b_1$ ), et entre les étapes  $b_1$ ) et  $c_1$ ).

                 Ce dosage utilise donc les deux anticorps  
15             $AC_1$  et  $AC_2$ , l'anticorps  $AC_1$  étant immobilisé sur la phase solide et l'anticorps  $AC_2$  étant couplé à un marqueur.

                 Selon un autre mode de mise en œuvre préféré du procédé selon l'invention,  $E_2$  correspondant,  
20            dans le composé  $E_2-X_2-G_2$ , à un groupe apte à former au moins une liaison covalente avec l'anticorps  $AC_1$ , ledit au moins un dosage immunologique du composé Z est un dosage de type "SPIE-IA" (Solid-Phase Epitope ImmunoAssay) tel que décrit dans US-A-5,476,770 [7], et  
25            l'étape ii) comprend les étapes suivantes :

$a_2$ ) mettre le milieu réactionnel obtenu au temps  $t$  de réaction en contact avec une phase solide sur laquelle est immobilisé l'anticorps  $AC_1$ , pour obtenir la fixation du composé Z sur cette phase solide  
30            par liaison immunologique entre cet anticorps et le reste  $E_1$  de ce composé ;

b<sub>2</sub>) faire réagir un agent de couplage avec l'anticorps AC<sub>1</sub> immobilisé sur la phase solide et le groupe E<sub>2</sub> du composé Z fixé sur cette phase solide, pour obtenir la formation d'une ou plusieurs liaisons covalentes entre cet anticorps et ce groupe ;

c<sub>2</sub>) dénaturer la liaison immunologique existant entre l'anticorps AC<sub>1</sub> immobilisé sur la phase solide et le reste E<sub>1</sub> du composé Z fixé sur cette phase solide, pour libérer ce reste de cette phase solide ;

d<sub>2</sub>) mettre la phase solide en contact avec un conjugué comprenant l'anticorps AC<sub>1</sub> couplé à un marqueur, pour obtenir la fixation de ce conjugué par liaison immunologique entre ledit anticorps et le reste E<sub>1</sub> du composé Z ainsi libéré ;

e<sub>2</sub>) mesurer la quantité de conjugué fixé sur la phase solide à l'aide du marqueur couplé à l'anticorps AC<sub>1</sub> ; et

f<sub>2</sub>) déterminer sur une gamme d'étalonnage la concentration en composé Z du milieu réactionnel audit temps  $t$  à partir de la quantité de conjugué ainsi mesurée ;

ladite étape ii) comprenant, de plus, une ou plusieurs opérations de lavage de la phase solide entre les étapes a<sub>2</sub>) et b<sub>2</sub>), b<sub>2</sub>) et c<sub>2</sub>), c<sub>2</sub>) et d<sub>2</sub>), et entre les étapes d<sub>2</sub>) et e<sub>2</sub>).

Ce dosage n'utilise, lui, que l'anticorps AC<sub>1</sub> mais sous deux formes différentes : une première forme dans laquelle il est immobilisé sur la phase solide et une deuxième forme dans laquelle il est couplé à un marqueur.



L'agent de couplage que l'on utilise à l'étape b<sub>2</sub>) peut être un réactif chimique, auquel cas il convient qu'il soit bifonctionnel, c'est-à-dire qu'il comprenne un premier groupe fonctionnel apte à réagir avec le groupe E<sub>2</sub> du composé E<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>-G<sub>2</sub>, et un deuxième groupe fonctionnel, identique ou différent du premier, apte à réagir avec l'anticorps AC<sub>1</sub>.

Selon que ces groupes fonctionnels sont identiques ou différents, il peut s'agir d'un réactif homo-bifonctionnel comme le glutaraldéhyde, le difluoro-dinitrobenzene, le bis-(maléimido)hexane ou le disuccinimidyl subérate, ou d'un réactif hétéro-bifonctionnel comme le N-succinimidyl-3-3-(2-pyridyldithio)propionate ou le succinimidyl-4-(N-maléimido-méthyl)-cyclohexane-1-carboxylate.

De préférence, on utilise le glutaraldéhyde ou le disuccinimidyl subérate.

En variante, l'agent de couplage peut être une irradiation, par exemple ultra-violette, dans le cas où E<sub>2</sub> représente un groupe photo-activable.

A l'étape c<sub>2</sub>), la dénaturation de la liaison immunologique existant entre l'anticorps AC<sub>1</sub> et le reste E<sub>1</sub> du composé Z peut être effectuée de façon classique au moyen d'un réactif approprié, ou encore sous l'action d'ultrasons ou de la chaleur.

Ce réactif peut être choisi parmi les acides comme HCl, les bases comme NaOH, les solvants organiques comme, par exemple, les alcools du type méthanol, les agents tensioactifs et les sels minéraux.

Quelle que soit la technique choisie pour doser le composé Z :

- l'anticorps AC<sub>1</sub> et, le cas échéant, l'anticorps AC<sub>2</sub> peuvent être des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, même si, d'une manière générale, on préfère utiliser des anticorps monoclonaux en raison de leur plus grande spécificité ;

- l'immobilisation de l'anticorps AC<sub>1</sub> sur la phase solide peut être une immobilisation passive ou active ; ainsi, cette immobilisation peut être obtenue par simple adsorption dudit anticorps à la surface de la phase solide, par liaison covalente, par l'intermédiaire de molécules de liaison comme le système avidine-biotine, ou encore par l'intermédiaire d'une étiquette polyhistidine associée au complexe nickel ou cuivre/NTA (acide nitrilo triacétique) ; lorsque l'anticorps AC<sub>1</sub> est un anticorps monoclonal, son immobilisation sur la phase solide peut être également obtenue par l'intermédiaire d'un anticorps polyclonal préalablement adsorbé à la surface de cette phase solide ;

- la phase solide peut être l'une quelconque des phases solides classiquement employées pour les dosages immunologiques comme la paroi d'un tube ou d'un puits d'un plaque de microtitration, une membrane constituée d'un matériau plastique comme le polystyrène ou la nitrocellulose, des billes de verre, des billes magnétiques et, de manière générale, toute surface sur laquelle il est possible de fixer, de manière passive ou active, un anticorps ; et

- le marqueur peut être un isotope comme l'iode 125, le chrome 51 ou le tritium, une enzyme comme la peroxydase de raifort, la phosphatase

alcaline, l'acétylcholine estérase ou la glucose oxydase, un marqueur luminescent comme le pyrogallol, le luminol ou l'isoluminol, un marqueur fluorescent comme la fluoroscéine, l'isothiocyanate de fluorescéine, la rhodamine ou la cyanine, ou encore une substance capable de réagir avec l'avidine ou la streptavidine comme la biotine et ses analogues structuraux ; dans ce dernier cas, l'avidine ou la streptavidine est elle-même marquée, par exemple par une enzyme ou un fluorochrome.

De préférence, l'anticorps AC<sub>1</sub> et, le cas échéant, l'anticorps AC<sub>2</sub> sont des anticorps monoclonaux ; la phase solide est la paroi d'un puits d'une plaque de microtitration ; l'immobilisation de l'anticorps AC<sub>1</sub> est réalisée par adsorption passive de cet anticorps à la surface de cette phase et le marqueur est une enzyme, notamment l'acétylcholine estérase, en raison de son "turn-over" (16 000 molécules de substrat hydrolysées par seconde et par site) qui confère aux conjugués qui la renferment une forte activité spécifique.

Conformément à l'invention, le procédé comprend, avantageusement, une opération de dilution du milieu réactionnel entre les étapes i) et ii).

Par ailleurs, les effets de la ou des conditions opératoires candidates sur la réaction de couplage sont, de préférence, évalués à l'étape iii) en déterminant le rendement de cette réaction à partir de la concentration en composé 2 du milieu réactionnel telle que déterminée à l'étape ii).

Ce rendement peut, par exemple, être calculé en appliquant la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \left( \frac{[Z] \times f}{[E_1 - X_1 - G_1]} \right) \times 100$$

5 dans laquelle :

- $[Z]$  est la concentration en composé Z du milieu réactionnel telle que déterminée à l'étape ii) et  $f$  est le facteur de dilution de ce milieu dans le cas où ce dernier a été soumis à une dilution entre l'étape i) et

10 l'étape ii), tandis que

- $[E_1 - X_1 - G_1]$  est la concentration initiale en composé  $E_1 - X_1 - G_1$  du milieu réactionnel.

Comme précédemment indiqué, la réaction de couplage, dont on souhaite cribler les conditions

15 opératoires, peut consister à coupler deux ou plus de deux groupements fonctionnels, le nombre de groupements fonctionnels mis en jeu dans cette réaction étant, de préférence, égal à 2, 3 ou 4.

Lorsque la réaction de couplage consiste à

20 coupler deux groupements fonctionnels  $G_1$  et  $G_2$ , alors :

- à l'étape i), on fait réagir ensemble les composés de formules  $E_1 - X_1 - G_1$  et  $E_2 - X_2 - G_2$  pour obtenir la formation dans le milieu réactionnel d'un composé Z qui répond à la formule  $E_1 - X_1 - G_1 - G_2 - X_2 - E_2$  dans laquelle  $X_1$ ,

25  $X_2$ ,  $E_1$  et  $E_2$  ont la même signification que précédemment et  $G_1 - G_2$  représente le groupe d'atomes résultant du couplage entre lesdits groupements fonctionnels  $G_1$  et  $G_2$  ; tandis que

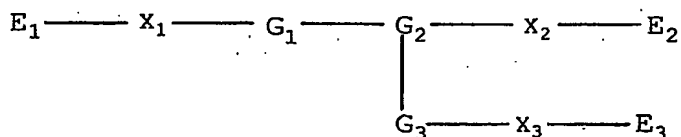
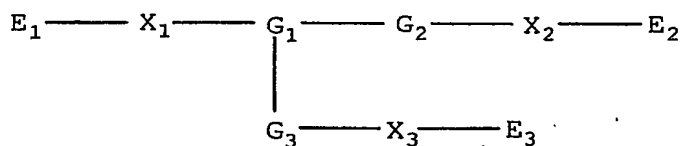
- à l'étape ii), la concentration en

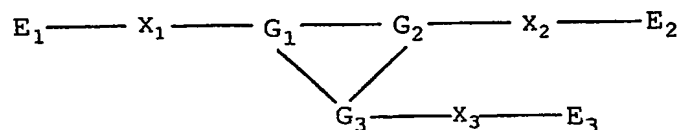
30 composé Z du milieu réactionnel est déterminée par un

seul dosage immunologique, lequel est, de préférence, un dosage en phase solide de type "sandwich" ou de type "SPIE-IA" tel que précédemment décrit.

Lorsque la réaction de couplage consiste à coupler trois groupements fonctionnels  $G_1$ ,  $G_2$  et  $G_3$ , alors :

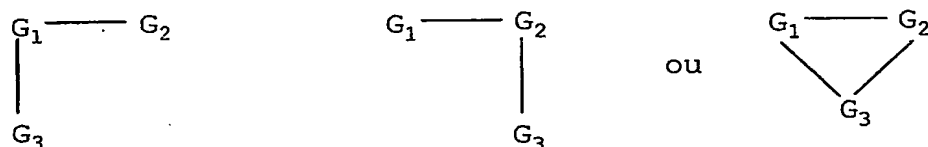
- à l'étape i), on fait réagir les composés de formules  $E_1-X_1-G_1$  et  $E_2-X_2-G_2$  avec un troisième composé de formule  $E_3-X_3-G_3$  dans laquelle  $X_3$  représente une liaison covalente ou un troisième groupe espaceur, identique ou différent de  $X_1$  et/ou de  $X_2$ , tandis que  $E_3$  représente, soit le reste d'une troisième molécule  $M_3$  différente de  $M_1$  et de  $M_2$  et pour laquelle on dispose d'un troisième anticorps  $AC_3$  spécifique, soit un groupe apte à former une liaison covalente avec l'anticorps  $AC_1$  en présence d'un agent de couplage à condition toutefois que  $E_2$  ne représente pas déjà un tel groupe, pour obtenir la formation dans le milieu réactionnel d'un composé  $Z$  répondant à l'une des formules ci-après :





dans lesquelles  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $E_1$ ,  $E_2$  et  $E_3$  ont la même signification que précédemment et

5



représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits groupements fonctionnels  $G_1$ ,  $G_2$  et  $G_3$  ; tandis  
10 que

- à l'étape ii), la concentration en composé Z du milieu réactionnel est déterminée par deux dosages immunologiques différents.

Ces dosages, qui peuvent être conduits en  
15 parallèle, c'est-à-dire sur deux échantillons différents du milieu réactionnel, ou l'un à la suite de l'autre sur le même échantillon du milieu réactionnel, sont préférentiellement tous deux effectués en phase solide.

20 Ainsi, il peut s'agir de deux dosages de type "sandwich" que l'on réalise en utilisant :

- pour le premier dosage, l'anticorps  $AC_1$  immobilisé sur la phase solide et l'anticorps  $AC_2$  couplé à un premier marqueur, et
- 25 - pour le deuxième dosage, l'anticorps  $AC_1$  immobilisé sur la phase solide et l'anticorps  $AC_3$  couplé à un deuxième marqueur,

les premier et deuxième marqueurs pouvant être identiques dans le cas où les deux dosages sont conduits en parallèle, mais devant être différents dans le cas où ils sont conduits l'un à la suite de l'autre.

5                   En variante, le premier dosage peut être un dosage de type "SPIE-IA" que l'on réalise en utilisant l'anticorps  $AC_1$  comme précédemment décrit, auquel cas le deuxième dosage est un dosage de type "sandwich" que l'on réalise en utilisant l'anticorps  $AC_2$  ou  
10 l'anticorps  $AC_3$  couplé à un marqueur selon que, dans les composés  $E_2-X_2-G_2$  et  $E_3-X_3-G_3$ , c'est  $E_2$  ou  $E_3$  qui représente le groupe apte à former une ou plusieurs liaisons covalentes avec l'anticorps  $AC_1$  au cours du dosage "SPIE-IA".

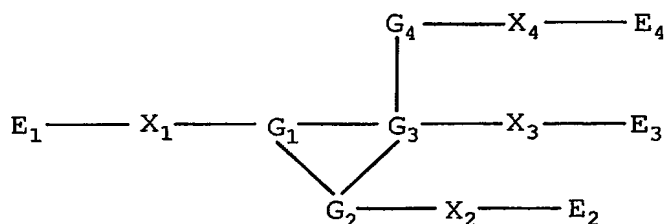
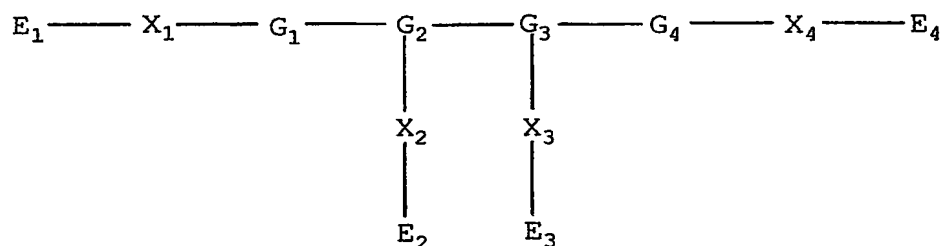
15                   Dans tous les cas, la formation du composé Z dans le milieu réactionnel est garantie par la concordance des concentrations en ce composé telles que déterminées par les deux dosages.

                  Lorsque la réaction de couplage consiste à  
20 coupler quatre groupements fonctionnels  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_3$  et  $G_4$ , alors :

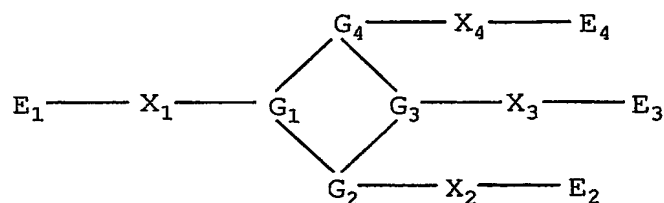
                  - à l'étape i), on fait réagir les composés de formule  $E_1-X_1-G_1$  et  $E_2-X_2-G_2$  avec un troisième composé de formule  $E_3-X_3-G_3$  telle que précédemment définie et un  
25 quatrième composé de formule  $E_4-X_4-G_4$  dans laquelle  $X_4$  représente une liaison covalente ou un quatrième groupe espaceur, identique ou différent de  $X_1$ ,  $X_2$  et/ou  $X_3$ , tandis que  $E_4$  représente soit le reste d'une troisième molécule  $M_4$  différente de  $M_1$ , de  $M_2$  et de  $M_3$  et pour  
30 laquelle on dispose d'un quatrième anticorps  $AC_4$  spécifique, soit un groupe apte à former une liaison

covalente avec l'anticorps AC<sub>1</sub> en présence d'un agent de couplage à la condition toutefois que E<sub>2</sub> et E<sub>3</sub> ne représentent pas déjà un tel groupe, pour obtenir la formation dans le milieu réactionnel d'un composé Z

5 répondant à l'une des formules ci-après :



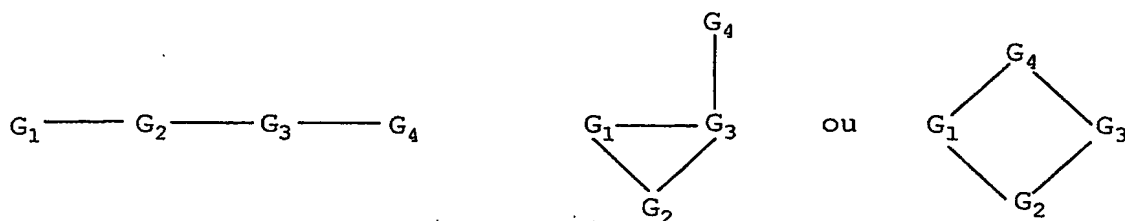
10



dans lesquelles X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub> et E<sub>4</sub> ont la même signification que précédemment et

15





représente le groupe d'atomes résultant du couplage  
desdits groupements fonctionnels  $G_1, G_2, G_3$  et  $G_4$  ;  
5 tandis que

- à l'étape ii), la concentration en  
composé Z du milieu réactionnel est déterminée par  
trois dosages immunologiques différents.

10 Là également, ces dosages peuvent être  
conduits en parallèle ou les uns à la suite des autres  
et sont préférentiellement tous trois effectués en  
phase solide. Il peut s'agir de trois dosages de type  
"sandwich" ou d'un dosage de type "SPIE-IA" suivi de  
deux dosages de type "sandwich", la formation du  
15 composé Z dans le milieu réactionnel étant, là encore,  
garantie par la concordance des résultats obtenus.

Conformément à l'invention, les conditions  
opératoires candidates sont, de préférence, choisies  
dans le groupe constitué par les solvants, les  
20 catalyseurs, les niveaux de température, les niveaux de  
pression, l'utilisation d'ultrasons, les concentrations  
(des substances mises à réagir et/ou du catalyseur),  
les rapports stœchiométriques (entre ces substances),  
les durées de réaction et leurs combinaisons.

25 Ainsi, le procédé selon l'invention peut  
aussi bien être utilisé pour cribler des conditions  
opératoires d'un seul type comme, par exemple, des  
catalyseurs ou des niveaux de température ou des

niveaux de pression, que pour cribler des combinaisons de conditions opératoires de types différents comme des combinaisons solvant/catalyseur, solvant/catalyseur/durée de la réaction, température/pression, catalyseur/5 température/pression, ou analogues.

Dans ce qui précède et ce qui suit, on entend par "catalyseur", tout agent qui, par sa seule présence au sein du milieu réactionnel, est apte à accélérer la cinétique d'une réaction.

10 Ce catalyseur peut être aussi bien un catalyseur chimique comme, par exemple, un composé organique, une base inorganique, un métal, un sel métallique, un oxyde ou hydruure métallique, un composé organométallique, un complexe métal-ligand, un  
15 halogénure, ou encore une combinaison de ceux-ci, ..., qu'un catalyseur biologique, ce dernier pouvant se présenter sous des formes très diverses, et notamment sous la forme d'un organe, d'un tissu, d'une cellule, d'une fraction cellulaire, d'un organite cellulaire,  
20 d'un extrait enzymatique, d'un complexe moléculaire ou encore d'une simple molécule, par exemple une enzyme isolée et purifiée.

Le procédé selon l'invention présente de nombreux avantages. En effet :

25 - il permet, dès lors que l'on dispose d'au moins une molécule apte à être greffée sur un groupement fonctionnel, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un groupe espaceur, et d'au moins un anticorps capable de reconnaître spécifiquement cette  
30 molécule et de se lier avec elle, de doser le composé résultant du couplage de deux groupements fonctionnels

et ce, quels que soient ces derniers ; de ce fait, il suffit de disposer de quelques molécules greffables et de quelques anticorps spécifiques de ces molécules pour être en mesure de cribler les conditions opératoires de  
5 très nombreuses réactions de couplage par le procédé selon l'invention ;

- il permet de tester simultanément différents types de conditions opératoires, soit en parallèle, soit en combinaison, et ce, qu'il s'agisse  
10 de conditions qualitatives ou quantitatives ;

- il est compatible avec tous les systèmes catalytiques, qu'ils soient chimiques ou biologiques ;

- il ne nécessite aucune opération de purification des milieux réactionnels obtenus à l'issue  
15 de la réaction de couplage ;

- il permet d'apprécier les effets des conditions opératoires de manière quantitative, en donnant accès au rendement de la réaction de couplage ;

- il est très sensible, puisqu'il s'est  
20 révélé permettre la détection d'une concentration en composé Z jusqu'à  $10^{-9}$  M, ce qui permet de le mettre en œuvre en utilisant des microvolumes de réactifs et de solvants ;

- il est reproductible ;

25 - il est simple à mettre en œuvre et ne requiert aucun équipement coûteux et/ou difficilement disponible ;

- il permet de réaliser des criblages à une cadence élevée ; ainsi, sa mise en œuvre sur un  
30 automate relativement simple, c'est-à-dire un automate assurant les lavages de la phase solide, une

distribution du substrat du marqueur enzymatique et la lecture de la réaction enzyme/substrat, mais n'assurant pas une distribution des autres réactifs, a permis à un seul expérimentateur de réaliser un millier de tests par jour. Cette cadence est donc susceptible d'être multipliée par un facteur 10 (soit 10 000 tests/jour) par l'utilisation d'appareils permettant une automatisation complète du procédé selon l'invention.

Le procédé selon l'invention est donc particulièrement bien adapté à la réalisation de criblages à "haut débit".

L'invention a aussi pour objet une trousse ou "kit" pour la mise en œuvre d'un procédé de criblage de conditions opératoires d'une réaction de couplage d'au moins deux groupements fonctionnels, qui comprend des quantités appropriées :

- d'au moins deux composés destinés à réagir ensemble :

• un premier composé de formule  $E_1-X_1-G_1$  dans laquelle  $G_1$  représente un premier desdits au moins deux groupements fonctionnels,  $X_1$  représente une liaison covalente ou un premier groupe espaceur et  $E_1$  représente le reste d'une première molécule  $M_1$  ; et

• un deuxième composé de formule  $E_2-X_2-G_2$  dans laquelle  $G_2$  représente un deuxième desdits au moins deux groupements fonctionnels,  $X_2$  représente une liaison covalente ou un deuxième groupe espaceur, identique ou différent de  $X_1$ , et  $E_2$  représente le reste d'une deuxième molécule  $M_2$  différente de  $M_1$  ;

- d'au moins deux anticorps :

- un premier anticorps  $AC_1$  spécifique de la première molécule  $M_1$ , cet anticorps étant éventuellement fixé sur une pluralité de phases solides ; et
- 5     • un deuxième anticorps  $AC_2$  spécifique de la deuxième molécule  $M_2$ , cet anticorps étant couplé à un marqueur ;
  - d'un composé  $Z$  comprenant l'enchaînement  $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$  dans lequel  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $E_1$  et  $E_2$  ont la même
  - 10   signification que précédemment, tandis que  $G_1-G_2$  représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits au moins deux groupements fonctionnels ; et éventuellement :
  - d'un réactif de révélation du marqueur,
  - 15   par exemple un substrat si le marqueur est une enzyme ; et
  - de tampons convenablement choisis (tampons de dilution, tampons de rinçage, ...).
- L'invention a encore pour objet une trousse
- 20   ou "kit" pour la mise en œuvre d'un procédé de criblage de conditions opératoires d'une réaction de couplage d'au moins deux groupements fonctionnels, qui comprend des quantités appropriées :
  - d'au moins deux composés destinés à
  - 25   réagir ensemble :
    - un premier composé de formule  $E_1-X_1-G_1$  dans laquelle  $G_1$  représente un premier desdits au moins deux groupements fonctionnels,  $X_1$  représente une liaison covalente ou un premier groupe espaceur et  $E_1$
    - 30   représente le reste d'une première molécule  $M_1$  ; et

• un deuxième composé de formule  $E_2-X_2-G_2$  dans laquelle  $G_2$  représente un deuxième desdits au moins deux groupements fonctionnels,  $X_2$  représente une liaison covalente ou un deuxième groupe espaceur, 5 identique ou différent de  $X_1$ , et  $E_2$  représente un groupe apte à former une ou plusieurs liaisons covalentes avec un anticorps spécifique de la molécule  $M_1$  en présence d'un agent de couplage ;

- d'au moins un anticorps, cet anticorps 10 étant ledit anticorps spécifique de la molécule  $M_1$  ;

- d'un conjugué comprenant ledit anticorps spécifique de la molécule  $M_1$  couplé à un marqueur ;

- d'un composé  $Z$  comprenant l'enchaînement 15  $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$  dans lequel  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $E_1$  et  $E_2$  ont la même signification que précédemment, tandis que  $G_1-G_2$  représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits au moins deux groupements fonctionnels ; et éventuellement :

- d'un réactif de révélation du marqueur, 20  
- d'un agent de couplage,  
- d'un réactif apte à dénaturer une liaison immunologique, et

- de tampons convenablement choisis.

L'invention a, en outre, pour objet 25 l'utilisation d'un procédé de criblage ou d'une trousse tel que précédemment défini pour le criblage, en particulier à "haut débit", de catalyseurs utiles dans une réaction de couplage entre deux groupements fonctionnels.

30 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui

ressortiront du complément de description qui suit, qui se rapporte à des exemples de modes de mise en œuvre du procédé selon l'invention ayant permis de valider à la fois sa faisabilité et son intérêt pour le criblage à "haut débit" de conditions opératoires.

Ce complément de description est donné à titre illustratif, et en aucun cas limitatif, et se réfère aux dessins annexés.

#### **BREVE DESCRIPTION DES DESSINS**

La figure 1 représente, sous une forme schématique, les différentes étapes d'un premier mode de mise en œuvre du procédé de criblage selon l'invention.

La figure 2 montre les résultats, en termes de rendements réactionnels, exprimés en %, d'un criblage de conditions opératoires réalisé conformément au premier mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention illustré sur la figure 1.

La figure 3 représente, sous une forme schématique, les différentes étapes d'un second mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention.

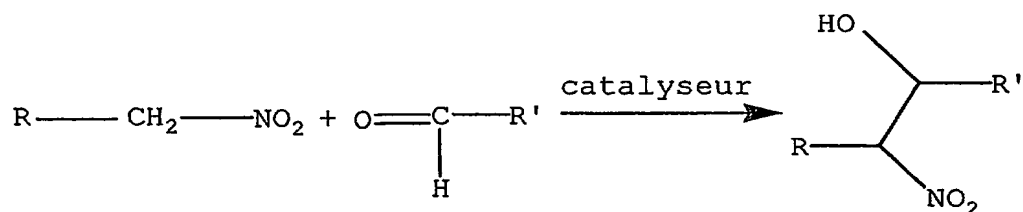
La figure 4 montre les résultats, en termes de rendements réactionnels, exprimés en %, d'un criblage de conditions opératoires réalisé conformément au second mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention illustré sur la figure 3.

# EXEMPLES DE MODES DE MISE EN ŒUVRE DU PROCÉDE SELON L'INVENTION

## EXEMPLE 1 :

Le présent exemple illustre un premier mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention dans lequel :

- la réaction de couplage est la réaction de nitro-aldolisation qui s'écrit :



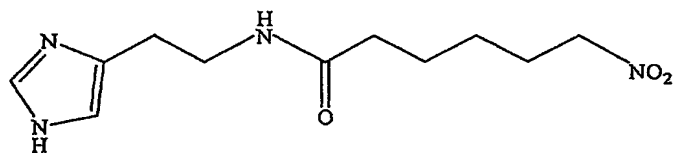
10

- le criblage porte sur trois types de conditions opératoires prises en combinaison, à savoir le type de solvant, le type de catalyseur et le temps de réaction ; et

- la concentration en composé Z des milieux réactionnels est déterminée par un dosage ELISA en phase solide de type "sandwich".

Le composé E<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-G<sub>1</sub> répond à la formule (V) ci-après :

20



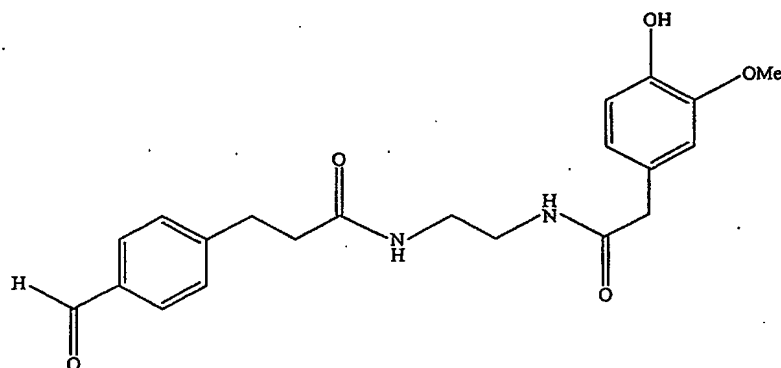
(V)

et résulte du couplage de l'acide 6-nitrocaproïque avec l'histamine.

25



Le composé  $E_2-X_2-G_2$  répond, lui, à la formule (VI) ci-après :



(VI)

5

et résulte du couplage du N-(2-amino-éthyl)-3-(4-formylphényl)propionamide avec l'acide homovanillique.

La réaction de couplage des composés  $E_1-X_1-G_1$  et  $E_2-X_2-G_2$  est réalisée en utilisant :

10

- deux solvants candidats : le tétrahydrofuranne (THF) et le chlorure de méthylène ( $CH_2Cl_2$ ) ;

15

- douze catalyseurs candidats : le fluorure de tétrabutylammonium (TBAF), le fluorure de potassium (KF), la triéthylamine (TEA), la pyridine (PYR), la diisopropylamine (DIA), le diazabicyclo octane (DABCO), la diisopropyléthylamine (DIEA), le diazabicyclo undecène (DBU), la diméthylaminopyridine (DMAP), le méthoxyde de sodium (NaOMe), la soude (NaOH) et le carbonate de potassium ( $K_2CO_3$ ), et

20

- quatre temps de réaction candidats : 30 minutes, 1 heure, 4 heures et 12 heures.

Le dosage immuno-enzymatique du composé Z (de formule  $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$ ) produit par la réaction de couplage est réalisé en utilisant :

- un anticorps monoclonal dirigé contre l'histamine (anticorps His-31 ;  $K_d : 10^{-9}$  M), qui a été immobilisé sur les parois des puits de plaques de microtitration en polystyrène (de capacité égale à 5 300  $\mu$ l/puits) par "coating", c'est-à-dire par adsorption passive de cet anticorps à la surface de polystyrène ;

- un conjugué comprenant un anticorps monoclonal dirigé contre l'acide homovanillique 10 (anticorps H6-92 ;  $K_d : 10^{-7}$  M), couplé à l'acétylcholine estérase (AChE), ce conjugué étant préparé et stocké comme décrit par Taran et al. dans *Clin. Chem.*, 1997, 43(2), 363-368 [8] ; et

- le réactif de révélation, qui comprend un 15 mélange d'iodure d'acétylthiocholine  $7,5 \cdot 10^{-4}$  M et d'acide 5,5'-dithiobis-(2-nitro)benzoïque (réactif d'Ellman)  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4), pour mesurer la quantité de conjugué anticorps H6-92/AChE fixé sur la phase solide.

20 L'adsorption de l'anticorps His-31 à la surface des parois des puits des plaques de microtitration a été obtenue en déposant 100  $\mu$ l d'une solution de cet anticorps à 5  $\mu$ l/ml dans du tampon phosphate 0,05 M, (pH 7,4) dans chacun de ces puits et 25 en laissant les plaques pendant 18 heures à température ambiante. A la suite de quoi, les puits ont été lavés et saturés par 300  $\mu$ l de tampon EIA, et les plaques ont été recouvertes de scotch et stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Le procédé, dont les différentes étapes sont schématisées sur la figure 1, est mis en œuvre selon le mode opératoire suivant.

5            1) Mode opératoire :

\* Réaction de couplage (étape A de la figure 1) :

Après avoir protégé la fonction amine  
secondaire portée par le cycle azoté du reste de  
10 l'histamine présent dans le composé  $E_1-X_1-G_1$  (reste  $E_1$ )  
par un groupe BOC ( $GP_1$  sur la figure 1), et la fonction  
hydroxyle portée par le cycle du reste de l'acide  
homovanillique présent dans le composé  $E_2-X_2-G_2$  (reste  
 $E_2$ ), par un groupe diméthyl *tert*-butylsilyle ( $GP_2$  sur la  
15 figure 2), on dépose successivement, dans chacun des  
puits de plaques de microtitration en polypropylène  
(capacité : 300  $\mu$ L/ puits) :

- 50  $\mu$ L d'une solution organique 5 mM du  
composé  $E_1-X-G_1$ ,

20            - 50  $\mu$ L d'une solution organique 5 mM du  
composé  $G_2-Y-E_2$ , et

- 25  $\mu$ L d'une solution organique 1 mM d'un  
catalyseur candidat,  
un seul et même solvant (THF ou  $CH_2Cl_2$ ) étant utilisé  
25 dans chaque puits.

Les plaques de microtitration sont placées  
dans un agitateur incubateur, à une température de  
40°C, et y sont maintenues le temps de réaction désiré.

**\* Arrêt de la réaction de couplage et déprotection (étape B de la figure 1) :**

La réaction de couplage est stoppée et les groupements protecteurs sont enlevés par addition de  
5 125  $\mu$ l d'acide trifluoroacétique (TFA) pur dans les puits. Les plaques sont agitées pendant 15 minutes à température ambiante.

**\* Dilution des milieux réactionnels (étape C de la figure 1) :**

Chaque milieu réactionnel est dilué en prélevant 10  $\mu$ l de ce milieu et en l'ajoutant à 1 ml de tampon EIA (tampon phosphate 0,1 M ; NaCl 0,15 M; BSA 0,1% ; azoture de sodium 0,01% ; pH 7,4) contenu dans  
15 un puits de plaques deep-well (capacité : 2 ml/puits).

Cette opération est répétée deux fois en sorte que chaque milieu réactionnel est dilué  $10^6$  fois.

**\* Dosage du composé Z :**

20 50  $\mu$ l de chaque milieu réactionnel dilué sont déposés dans un puits d'une plaque de microtitration dont la paroi des puits est revêtue de l'anticorps His-31 (étape D de la figure 1).

La plaque est agitée pendant 1 heure à  
25 température ambiante, puis lavée 5 fois par un tampon de lavage consistant en un tampon phosphate 0,01 M, pH 7,4, contenant 0,05% de Tween® 20 (étape E de la figure 1).

Puis, on dépose, dans chaque puits, 50  $\mu$ l  
30 d'une solution du conjugué H6-92/AChE à 5 unités Ellman/ml (UE), une unité Ellman étant définie comme la

quantité d'enzyme apte à produire une augmentation d'absorbance d'une unité pendant une minute dans un ml de réactif Ellman, pour un chemin optique d'un cm à 25°C (étape F de la figure 1).

5 La plaque est agitée pendant 3 heures à température ambiante, puis lavée 5 fois par le tampon de lavage (étape G de la figure 1).

200 µl de réactif de révélation (RV) sont alors introduits dans chaque puits. La plaque est  
10 agitée pendant 1 heure à température ambiante au terme de laquelle on mesure la densité optique (DO) à 414 nm du milieu contenu dans chaque puits au moyen d'un lecteur automatique.

A partir des valeurs de DO ainsi obtenues,  
15 on détermine, pour chaque milieu réactionnel, sa concentration en composé Z, par référence à une gamme étalon (qui permet de relier une valeur d'absorbance à une concentration en composé Z), puis le rendement de la réaction de nitro-aldolisation au moyen de la  
20 formule de calcul du rendement précédemment mentionnée.

## 2) Résultats :

Les résultats sont présentés sur la figure 2, sous la forme d'une matrice dans laquelle les  
25 rendements réactionnels (exprimés en %) sont symbolisés par des ronds blancs, gris clair, gris moyen ou gris foncé, selon qu'ils sont compris entre 0 et 10%, entre 10 et 30%, entre 30 et 50% ou entre 50 et 70%.

Ces ronds sont répartis sur 8 lignes  
30 correspondant chacune à un temps de réaction candidat, et sur 12 colonnes correspondant chacune à un

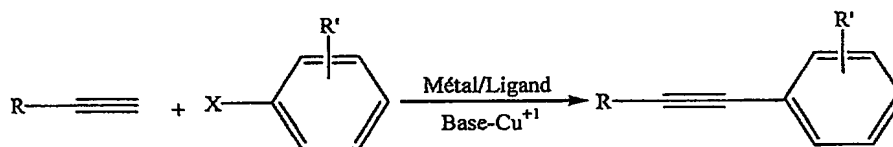
catalyseur candidat, les 4 lignes supérieures regroupant les rendements des réactions réalisées dans le THF, et les 4 lignes inférieures regroupant les rendements des réactions réalisées dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

5 La figure 2 montre, par exemple, que lorsque la réaction de nitro-aldolisation est effectuée pendant 4 heures dans du THF, seuls le diazabicyclo octane (DABCO) et la diméthylaminopyridine (DMAP) permettent d'obtenir un rendement réactionnel supérieur  
10 à 50%, alors que, lorsqu'elle est réalisée pendant le même temps dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , un tel rendement n'est obtenu qu'en présence de fluorure de tétra-butylammonium (TBAF).

## 15 EXEMPLE 2 :

Cet exemple illustre un deuxième mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention dans lequel :

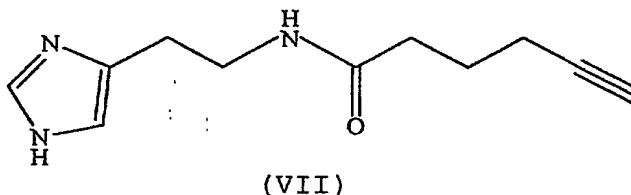
20 - la réaction de couplage est la réaction de Sonogashira qui s'écrit :



25 - le criblage porte sur deux types de conditions opératoires prises en combinaison, à savoir le type de solvant et le type de catalyseur ; et

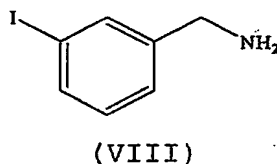
- la concentration en composé Z des milieux réactionnels est déterminée par un dosage immuno-enzymatique en phase solide de type "SPIE-IA".

Dans cet exemple, le composé E<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-G<sub>1</sub> répond à la formule (VII) ci-après :



et résulte du couplage de l'acide 5-hexynoïque avec l'histamine.

Le composé E<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>-G<sub>2</sub> répond, lui, à la formule (VIII) ci-après :



La réaction de couplage des composés E<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-G<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>-G<sub>2</sub> est réalisée en utilisant :

- trois solvants candidats : le diméthylformamide (DMF), le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le THF ;

- une banque de catalyseurs préparée *in situ* et dans laquelle chaque catalyseur correspond à une combinaison entre :

(1) un complexe métallique M choisi parmi les complexes M1 à M7 suivants :

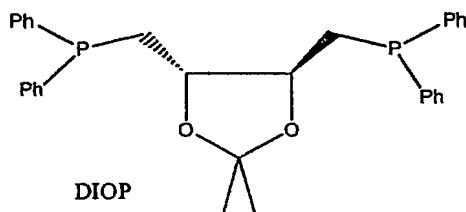
- 25
- M1 : Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>
  - M2 : Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>
  - M3 : Pd(OAc)<sub>2</sub>
  - M4 : PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
  - M5 : PdCl<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CN)<sub>2</sub>

M6 :  $\text{Pd}(\text{NH}_3)_4(\text{NO}_3)_2$

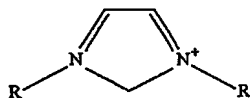
M7 :  $\text{Ni}(\text{acac})$ , et

(2) un ligand L choisi parmi les 23 ligands suivants :

- 5       • les ligands L1 à L12 répondant à la formule  $\text{PR}_3$  dans laquelle R est respectivement un groupe *n*-butyle, *n*-octyle, *t*-butyle,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ , phényle, *o*-tolyle,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ , *o,p*-di- $\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_3$  et *o*-furyle ;
- 10       • les ligands L13 à L17 répondant à la formule  $\text{R}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{PR}_2$  dans laquelle R est un groupe méthyle et *n* est égal à 1 ou 2 (L13, L14), R est un groupe phényle et *n* est égal à 1, 2 ou 4 (L15, L16, L17) ;
- 15       • le ligand L18 ou ligand DIOP de formule :



- 20       • les complexes d'arsenic L19 et L20 de formule  $\text{AsPh}_3$  et  $(\text{Ph}_2)\text{As}(\text{CH}_2)_2\text{As}(\text{Ph}_2)$  ;
- les imidazoliums L21 à L23 répondant à la formule :



- 25       dans laquelle R est un groupe éthyle et R' est un groupe méthyle (L21) ; R et R' sont des



groupes t-butyle (L22) ; R et R' sont des groupes 2,6-diisopropylbenzene ;

(3) en présence d'une base choisie parmi la diisopropyléthylamine (DIEA) et le tert-butoxyde de potassium (tBuOK), et de sels de cuivre choisis parmi l'iodure de cuivre (CuI) et le triflate de cuivre (CuOTf).

Le dosage immuno-enzymatique du composé Z (de formule  $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$ ) produit par la réaction de couplage est réalisé en utilisant :

- un anticorps monoclonal dirigé contre l'histamine (anticorps His-76 ;  $K_d : 10^{-8}$  M), qui a été immobilisé sur la paroi des puits de plaques de microtitration en polystyrène (capacité : 300  $\mu$ l/puits) par "coating", selon une technique analogue à celle décrite dans l'exemple 1 ;

- un conjugué comprenant cet anticorps couplé à l'AChE ; et

- le réactif de révélation décrit dans l'exemple 1 pour mesurer la quantité de conjugué His-76/AChE fixé sur la phase solide.

Le procédé, dont les différentes étapes sont schématisées sur la figure 3, est mis en œuvre selon le mode opératoire suivant.

25

#### 1) Mode opératoire :

\* Réaction de couplage (étape A de la figure 3) :

Après avoir protégé la fonction amine portée par le cycle azoté du reste de l'histamine présent dans le composé  $E_1-X_1-G_1$  (reste  $E_1$ ) A et la

30

fonction amine du composé  $E_2-X_2-G_2$  par des groupes BOC (GP sur la figure 3), on dépose successivement, dans chacun des puits de plaques de microtitration en polypropylène (capacité égale : 300  $\mu$ l/puits) et sous

5 atmosphère inerte :

- 5  $\mu$ l d'un solvant ou d'une solution organique 16 mM d'un complexe métallique M,

- 5  $\mu$ l d'un solvant ou d'une solution organique 32 mM d'un ligand L,

10 - 25  $\mu$ l d'une solution organique comprenant le composé  $E_2-X_2-G_2$  à 160 mM, un sel de cuivre à 6,4 mM, une base à 480 mM, et

- 5  $\mu$ l d'une solution organique 800 mM du composé  $E_1-X_1-G_1$ ,

15 un seul et même solvant (DMF, DMSO ou THF) étant utilisé pour chaque puits.

Les plaques sont placées dans un agitateur incubateur, à une température de 25°C, et y sont maintenues 24 heures.

20

**\* Arrêt de la réaction de couplage et déprotection (étape B de la figure 3) :**

La réaction de couplage est stoppée et les groupements BOC sont enlevés par addition de 40  $\mu$ l de

25 TFA pur dans chaque puits. Les plaques sont agitées pendant 1 heure à température ambiante.

**\* Dilution des milieux réactionnels (étape C de la figure 3) :**

30 Chaque milieu réactionnel est dilué en prélevant 10  $\mu$ l de ce milieu et en l'ajoutant à 1 ml de

tampon EIA contenu dans un puits d'une plaque deep-weel (capacité : 2 ml/puits).

Cette opération est répétée deux fois en sorte que chaque milieu réactionnel est dilué  $10^6$  fois.

5

**\* Dosage du composé Z :**

100  $\mu$ l de chaque milieu réactionnel dilué sont déposés dans un puits d'une plaque de microtitration dont la paroi des puits a été  
10 préalablement revêtue de l'anticorps His-76.

Les plaques sont agitées pendant 1 heure à température ambiante, puis lavées 5 fois par du tampon de lavage consistant en un tampon phosphate 0,01 M, pH 7,4, contenant 0,05% de Tween® 20 (étape D de la figure  
15 3).

Puis, on ajoute, dans chaque puits, 100  $\mu$ l d'un tampon borate 0,1 M (pH 9) et 10  $\mu$ l d'une solution de subérate de disuccinimidyle (DSS) à 10 mg/ml dans du DMF.

20 Les plaques sont agitées pendant 15 minutes à température ambiante, puis lavées 5 fois par le tampon de lavage (étape E de la figure 3).

On dépose alors, dans chaque puits, 150  $\mu$ l de NaOH 1N que l'on laisse agir 5 minutes à température  
25 ambiante. A l'issue de quoi, les plaques sont lavées 5 fois par le tampon de lavage (étape F de la figure 3).

On introduit, dans chaque puits, 100  $\mu$ l d'une solution du conjugué His-76/AChE à une unité Ellman/ml et les plaques sont agitées pendant 1 heure à  
30 température ambiante, puis lavées 5 fois par le tampon de lavage (étape G de la figure 3).

Pour mesurer la quantité du conjugué s'étant fixé sur la phase solide, on procède comme dans l'exemple 1, la mesure de la densité optique (DO) à 414 nm étant réalisée après 30 minutes ou 1 heure de  
5 réaction enzymatique.

A partir des valeurs de DO ainsi obtenues, on détermine, pour chaque milieu réactionnel, sa concentration en composé Z, par référence à une gamme étalon, puis le rendement de la réaction de Sonogashira  
10 par la même formule que celle utilisée dans l'exemple 1 ci-avant.

## 2) Résultats :

A titre illustratif, une partie des  
15 résultats est présentée sur la figure 4, sous la forme d'une matrice dans laquelle les rendements réactionnels (exprimés en %) sont symbolisés par des ronds allant du blanc au gris foncé, selon qu'ils sont compris entre 0 et 10%, entre 10 et 20%, entre 20 et 30%, entre 30 et  
20 40% ou entre 40 et 50%.

Ces ronds sont répartis sur 8 lignes qui correspondent pour la première, à l'absence de complexe métallique M (ligne M0) et pour les 7 autres, à l'un des complexes métalliques M1 à M7, et sur 24 colonnes  
25 qui correspondent pour la première, à l'absence de ligand L (colonne L0) et pour les 23 autres, aux ligands L1 à L23.

Les résultats présentés sur la figure 4 sont ceux obtenus en utilisant le DMF comme solvant, la  
30 DIEA comme base, l'iodure de cuivre comme sel de cuivre, 2% de métal M et 4% de ligand L.

On peut remarquer à la lumière de ces résultats que deux ligands (L12 et L19) s'avèrent les plus efficaces lorsqu'ils sont combinés au palladium.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Lavastre et Morken, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38(21), 3163-3165
- 5 [2] Böhm et Herrmann, *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, 3679-3681
- [3] Löber et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 4366-4367
- [4] Shaugnessy et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 2123-2132
- 10 [5] Blackmond et al., *Organic Process Research & Development*, 1999, 3(4), 275-280
- [6] Hinderling et Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38(15), 2253-2256
- 15 [7] US-A-5,476,770
- [8] Taran et al., *Clin. Chem.*, 1997, 43(2), 363-368

## REVENDICATIONS

1. Procédé de criblage de conditions opératoires d'une réaction de couplage d'au moins deux  
5 groupements fonctionnels, qui comprend les étapes suivantes :

i) faire réagir ensemble au moins deux composés :

• un premier composé de formule  $E_1-X_1-G_1$  dans  
10 laquelle  $G_1$  représente un premier desdits au moins deux groupements fonctionnels,  $X_1$  représente une liaison covalente ou un premier groupe espaceur, tandis que  $E_1$  représente le reste d'une première molécule  $M_1$  pour laquelle on dispose d'un premier anticorps  $AC_1$   
15 spécifique, et

• un deuxième composé de formule  $E_2-X_2-G_2$  dans laquelle  $G_2$  représente un deuxième desdits au moins deux groupements fonctionnels,  $X_2$  représente une liaison covalente ou un deuxième groupe espaceur,  
20 identique ou différent de  $X_1$ , tandis que  $E_2$  représente, soit le reste d'une deuxième molécule  $M_2$  différente de  $M_1$  et pour laquelle on dispose d'un deuxième anticorps  $AC_2$  spécifique, soit un groupe apte à former au moins une liaison covalente avec l'anticorps  $AC_1$  en présence  
25 d'un agent de couplage ;

lesdits au moins deux composés étant mis à réagir en solution dans un solvant et dans des conditions opératoires prédéterminées dont l'une au moins est une condition opératoire candidate, pour obtenir un milieu  
30 réactionnel et la formation dans ce milieu d'un composé  $Z$  comprenant l'enchaînement  $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$  dans lequel

$X_1$ ,  $X_2$ ,  $E_1$  et  $E_2$  ont la même signification que précédemment, tandis que  $G_1$ - $G_2$  représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits au moins deux groupements fonctionnels ;

5                   ii) déterminer la concentration en composé Z du milieu réactionnel à un temps  $t$  de réaction prédéterminé, par au moins un dosage immunologique utilisant au moins l'anticorps  $AC_1$  ; et

10                   iii) évaluer les effets de la ou des conditions opératoires candidates sur ladite réaction de couplage à l'aide de la concentration en composé Z ainsi déterminée.

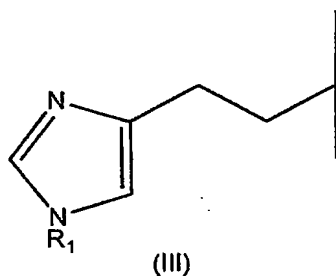
2. Procédé selon la revendication 1, dans  
15 lequel la réaction de couplage est choisie dans le groupe constitué par les réactions d'estérification, les réactions d'amidification, les réactions d'aldolisation et de nitro-aldolisation, la réaction de Heck, la réaction de Baylis-Hillman, la réaction de  
20 Michael, les réactions de métathèse, la réaction de Diels-Alder, la réaction de Sonogashira, la réaction de Suzuki, la réaction de Kumada, la réaction de Stille, la réaction de Hiyama, la réaction de Liebeskind-Srogl, la réaction de Mannich, la réaction de Hantzsch, la  
25 réaction de Bossio et al., la réaction de Ugi et leurs variantes.

3. Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans lequel  $E_1$  ou  $E_2$  représente le  
30 reste de l'histamine.



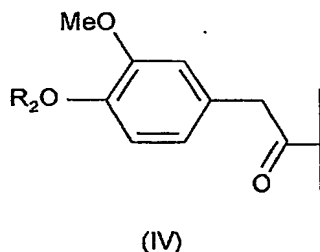
4. Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans lequel E<sub>1</sub> ou E<sub>2</sub> représente le reste de l'acide homovanillique.

5. Procédé selon la revendication 3, dans lequel E<sub>1</sub> ou E<sub>2</sub> répond à la formule (III) ci-après :



10 dans laquelle R<sub>1</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur.

6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel E<sub>1</sub> ou E<sub>2</sub> répond à la formule (IV) ci-après :



dans laquelle R<sub>2</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur.

7. Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans lequel E<sub>2</sub> représente un groupe

choisi parmi les groupes amine, acide carboxylique, aldéhyde, thiol, phénol, alkényle, azoture et les groupes photo-activables.

5                    8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel  $E_2$  représente un groupe amine ou thiol.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel ledit au moins un  
10 dosage immunologique du composé Z est un dosage en phase solide.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel,  $E_2$  correspondant au  
15 reste d'une molécule  $M_2$ , l'étape ii) comprend les étapes suivantes :

a<sub>1</sub>) mettre le milieu réactionnel obtenu au temps  $t$  de réaction en contact avec une phase solide sur laquelle est immobilisé le premier anticorps  $AC_1$ ,  
20 pour obtenir la fixation du composé Z sur cette phase solide par liaison immunologique entre cet anticorps et le reste  $E_1$  de ce composé ;

b<sub>1</sub>) mettre la phase solide en contact avec un conjugué comprenant le deuxième anticorps  $AC_2$  couplé  
25 à un marqueur, pour obtenir la fixation de ce conjugué sur cette phase solide par liaison immunologique entre le deuxième anticorps  $AC_2$  et le reste  $E_2$  du composé Z fixé sur ladite phase solide ;

c<sub>1</sub>) mesurer la quantité de conjugué fixé  
30 sur la phase solide à l'aide du marqueur couplé à l'anticorps  $AC_2$  ; et

d<sub>1</sub>) déterminer sur une gamme d'étalonnage la concentration en composé Z du milieu réactionnel audit temps t à partir de la quantité de conjugué ainsi mesurée ;

- 5 ladite étape ii) comprenant, de plus, une ou plusieurs opérations de lavage de la phase solide entre les étapes a<sub>1</sub>) et b<sub>1</sub>), et entre les étapes b<sub>1</sub>) et c<sub>1</sub>).

11. Procédé selon l'une quelconque des  
10 revendications 1, 2, 7 ou 8, dans lequel, E<sub>2</sub> correspondant à un groupe apte à former au moins une liaison covalente avec le premier anticorps AC<sub>1</sub>, l'étape ii) comprend les étapes suivantes :

15 a<sub>2</sub>) mettre le milieu réactionnel obtenu au temps t de réaction en contact avec une phase solide sur laquelle est immobilisé le premier anticorps AC<sub>1</sub>, pour obtenir la fixation du composé Z sur cette phase solide par liaison immunologique entre cet anticorps et le reste E<sub>1</sub> de ce composé ;

20 b<sub>2</sub>) faire réagir un agent de couplage avec le premier anticorps AC<sub>1</sub> immobilisé sur la phase solide et le groupe E<sub>2</sub> du composé Z fixé sur cette phase solide, pour obtenir la formation d'une ou plusieurs liaisons covalentes entre cet anticorps et ce groupe ;

25 c<sub>2</sub>) dénaturer la liaison immunologique existant entre le premier anticorps AC<sub>1</sub> immobilisé sur la phase solide et le reste E<sub>2</sub> du composé Z fixé sur cette phase solide, pour libérer ce reste de cette phase solide ;

30 d<sub>2</sub>) mettre la phase solide en contact avec un conjugué comprenant le premier anticorps AC<sub>1</sub> couplé

à un marqueur, pour obtenir la fixation de ce conjugué sur cette phase solide par liaison immunologique entre ledit anticorps et le reste  $E_1$  du composé  $E_1-X-G_1G_2-Y-E_2$  ainsi libéré ;

5                     $e_2$ ) mesurer la quantité de conjugué fixé sur la phase solide à l'aide du marqueur couplé à l'anticorps  $AC_1$  ; et

$f_2$ ) déterminer sur une gamme d'étalonnage la concentration en composé Z du milieu réactionnel  
10    audit temps  $t$  à partir de la quantité de conjugué ainsi mesurée ;

                    ladite étape ii) comprenant, de plus, une ou plusieurs opérations de lavage de la phase solide entre les étapes  $a_2$ ) et  $b_2$ ),  $b_2$ ) et  $c_2$ ),  $c_2$  et  $d_2$ ), et entre les  
15    étapes  $d_2$ ) et  $e_2$ ).

                    12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le premier anticorps  $AC_1$  est un anticorps monoclonal.

20

                    13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 10, dans lequel le deuxième anticorps  $AC_2$  est un anticorps monoclonal.

25                    14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la phase solide est la paroi d'un puits d'une plaque de microtitration sur laquelle est adsorbé le premier anticorps  $AC_1$ .

15. Procédé selon la revendication 10 ou la revendication 11, dans lequel le marqueur est une enzyme, de préférence, l'acétylcholine estérase.

5 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend une opération de dilution du milieu réactionnel entre les étapes i) et ii).

10 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel on détermine le rendement de la réaction de couplage à partir de la concentration en composé Z du milieu réactionnel.

15 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la réaction de couplage consiste à coupler 2, 3 ou 4 groupements fonctionnels.

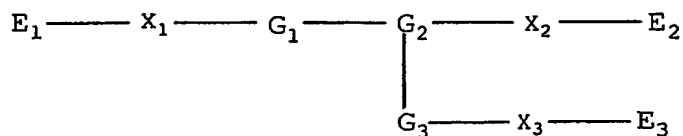
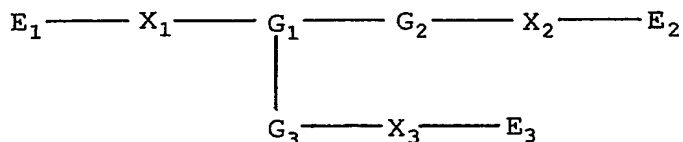
20 19. Procédé selon la revendication 18, dans lequel la réaction de couplage consiste à coupler deux groupements fonctionnels  $G_1$  et  $G_2$ , et dans lequel :

- à l'étape i), on fait réagir ensemble les composés de formules  $E_1-X_1-G_1$  et  $E_2-X_2-G_2$  pour obtenir la  
25 formation dans le milieu réactionnel d'un composé Z qui répond à la formule  $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$  dans laquelle  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $E_1$  et  $E_2$  ont la même signification que précédemment et  $G_1-G_2$  représente le groupe d'atomes résultant du couplage entre lesdits groupements fonctionnels  $G_1$  et  
30  $G_2$  ; tandis que

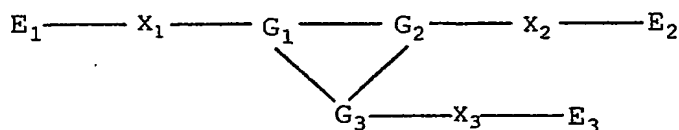
- à l'étape ii), la concentration en composé Z du milieu réactionnel est déterminée par un seul dosage immunologique.

5                    20. Procédé selon la revendication 18, dans lequel la réaction de couplage consiste à coupler trois groupements fonctionnels  $G_1$ ,  $G_2$  et  $G_3$ , et dans lequel :

10                    - à l'étape i), on fait réagir les composés de formules  $E_1-X_1-G_1$  et  $E_2-X_2-G_2$  avec un troisième composé de formule  $E_3-X_3-G_3$  dans laquelle  $X_3$  représente une liaison covalente ou un troisième groupe espaceur, identique ou différent de  $X_1$  et/ou de  $X_2$ , tandis que  $E_3$  représente, soit le reste d'une troisième molécule  $M_3$  différente de  $M_1$  et de  $M_2$  et pour laquelle on dispose  
15 d'un troisième anticorps  $AC_3$  spécifique, soit un groupe apte à former une liaison covalente avec l'anticorps  $AC_1$  en présence d'un agent de couplage à condition toutefois que  $E_2$  ne représente pas déjà un tel groupe, pour obtenir la formation dans le milieu réactionnel  
20 d'un composé Z répondant à l'une des formules ci-après :

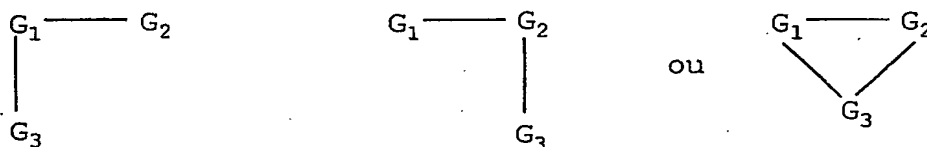


25



dans lesquelles  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $E_1$ ,  $E_2$  et  $E_3$  ont la même signification que précédemment et

5



représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits groupements fonctionnels  $G_1$ ,  $G_2$  et  $G_3$  ; tandis

10 que

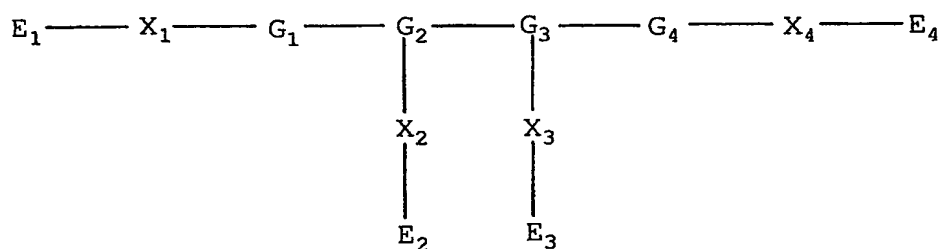
- à l'étape ii), la concentration en composé Z du milieu réactionnel est déterminée par deux dosages immunologiques différents.

15

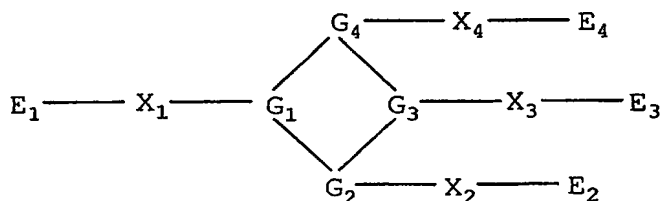
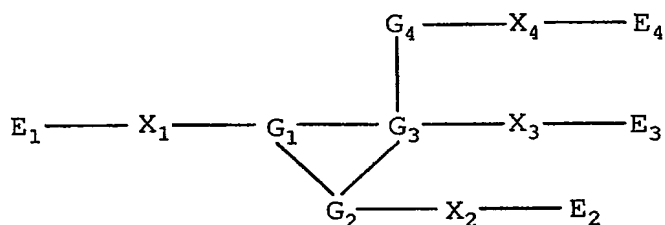
21. Procédé selon la revendication 18, dans lequel la réaction de couplage consiste à coupler quatre groupements fonctionnels  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_3$  et  $G_4$ , et dans lequel :

- à l'étape i), on fait réagir les composés de formule  $E_1-X_1-G_1$  et  $E_2-X_2-G_2$  avec un troisième composé de formule  $E_3-X_3-G_3$  telle que précédemment définie et un quatrième composé de formule  $E_4-X_4-G_4$  dans laquelle  $X_4$  représente une liaison covalente ou un quatrième groupe espaceur, identique ou différent de  $X_1$ ,  $X_2$  et/ou  $X_3$ , tandis que  $E_4$  représente soit le reste d'une troisième molécule  $M_4$  différente de  $M_1$ , de  $M_2$  et de  $M_3$  et pour laquelle on dispose d'un quatrième anticorps  $AC_4$

spécifique, soit un groupe apte à former une liaison covalente avec l'anticorps AC<sub>1</sub> en présence d'un agent de couplage à la condition toutefois que E<sub>2</sub> et E<sub>3</sub> ne représentent pas déjà un tel groupe, pour obtenir la formation dans le milieu réactionnel d'un composé Z répondant à l'une des formules ci-après :

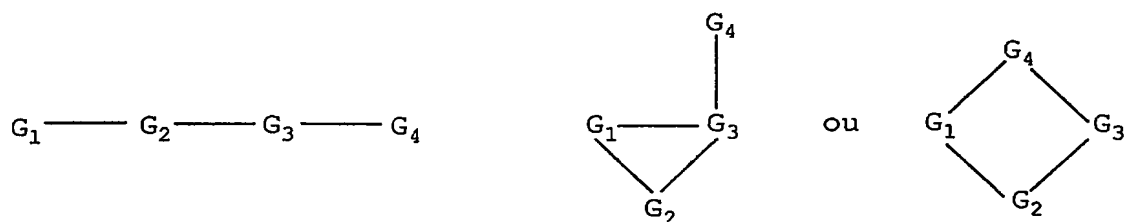


10



15 dans lesquelles X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub> et E<sub>4</sub> ont la même signification que précédemment et





5 représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits groupements fonctionnels  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_3$  et  $G_4$  ; tandis que

- à l'étape ii), la concentration en composé Z du milieu réactionnel est déterminée par  
10 trois dosages immunologiques différents.

22. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la ou les conditions opératoires candidates sont choisies dans le  
15 groupe constitué par les solvants, les catalyseurs, les niveaux de température, les niveaux de pression, l'utilisation d'ultrasons, les concentrations, les rapports stœchiométriques, les durées de réaction et leurs combinaisons.

20

23. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la ou les conditions opératoires candidates sont des catalyseurs.

25

24. Trousse ou "kit" pour la mise en œuvre d'un procédé de criblage de conditions opératoires d'une réaction de couplage d'au moins deux groupements fonctionnels, qui comprend des quantités appropriées :

- d'au moins deux composés destinés à réagir ensemble :

• un premier composé de formule  $E_1-X_1-G_1$  dans laquelle  $G_1$  représente un premier desdits au moins deux  
5 groupements fonctionnels,  $X_1$  représente une liaison covalente ou un premier groupe espaceur et  $E_1$  représente le reste d'une première molécule  $M_1$  ; et

• un deuxième composé de formule  $E_2-X_2-G_2$  dans laquelle  $G_2$  représente un deuxième desdits au moins  
10 deux groupements fonctionnels,  $X_2$  représente une liaison covalente ou un deuxième groupe espaceur, identique ou différent de  $X_1$ , et  $E_2$  représente le reste d'une deuxième molécule  $M_2$  différente de  $M_1$  ;

- d'au moins deux anticorps :

15 • un premier anticorps  $AC_1$  spécifique de la première molécule  $M_1$ , cet anticorps étant éventuellement fixé sur une pluralité de phases solides ; et

• un deuxième anticorps  $AC_2$  spécifique de la  
20 deuxième molécule  $M_2$ , cet anticorps étant couplé à un marqueur ;

- d'un composé  $Z$  comprenant l'enchaînement  $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$  dans lequel  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $E_1$  et  $E_2$  ont la même signification que précédemment, tandis que  $G_1-G_2$   
25 représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits au moins deux groupements fonctionnels ; et éventuellement :

- d'un réactif de révélation du marqueur, par exemple un substrat si le marqueur est une enzyme ;  
30 et

- de tampons convenablement choisis.

25. Trousse ou "kit" pour la mise en œuvre d'un procédé de criblage de conditions opératoires d'une réaction de couplage d'au moins deux groupements fonctionnels, qui comprend des quantités appropriées :

- d'au moins deux composés destinés à réagir ensemble :
  - un premier composé de formule  $E_1-X_1-G_1$  dans laquelle  $G_1$  représente un premier desdits au moins deux groupements fonctionnels,  $X_1$  représente une liaison covalente ou un premier groupe espaceur et  $E_1$  représente le reste d'une première molécule  $M_1$  ; et
  - un deuxième composé de formule  $E_2-X_2-G_2$  dans laquelle  $G_2$  représente un deuxième desdits au moins deux groupements fonctionnels,  $X_2$  représente une liaison covalente ou un deuxième groupe espaceur, identique ou différent de  $X_1$ , et  $E_2$  représente un groupe apte à former une ou plusieurs liaisons covalentes avec un anticorps spécifique de la molécule  $M_1$  en présence d'un agent de couplage ;
  - d'au moins un anticorps, cet anticorps étant ledit anticorps spécifique de la molécule  $M_1$  ;
  - d'un conjugué comprenant ledit anticorps spécifique de la molécule  $M_1$  couplé à un marqueur ;
  - d'un composé Z comprenant l'enchaînement  $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$  dans lequel  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $E_1$  et  $E_2$  ont la même signification que précédemment, tandis que  $G_1-G_2$  représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits au moins deux groupements fonctionnels ; et éventuellement :
  - d'un réactif de révélation du marqueur,

- d'un agent de couplage,
- d'un réactif apte à dénaturer une liaison immunologique, et
- de tampons convenablement choisis.

5

26. Utilisation d'un procédé de criblage selon l'une quelconque des revendications 1 à 23 ou d'une trousse ou "kit" selon la revendication 24 ou la revendication 25, pour le criblage, en particulier à  
10 "haut débit", de catalyseurs utiles dans une réaction de couplage entre deux groupements fonctionnels.

1 / 3

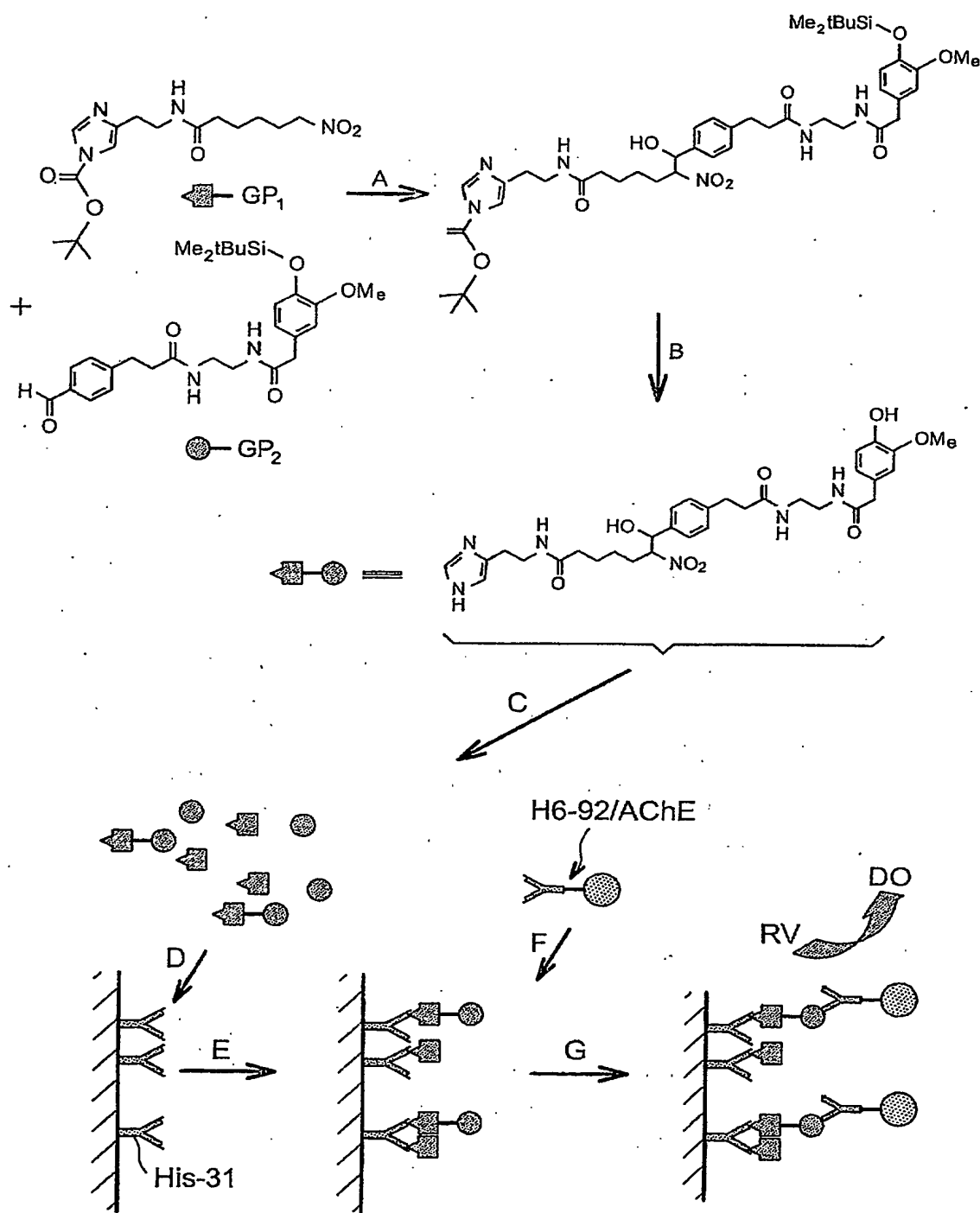


FIG. 1

2 / 3

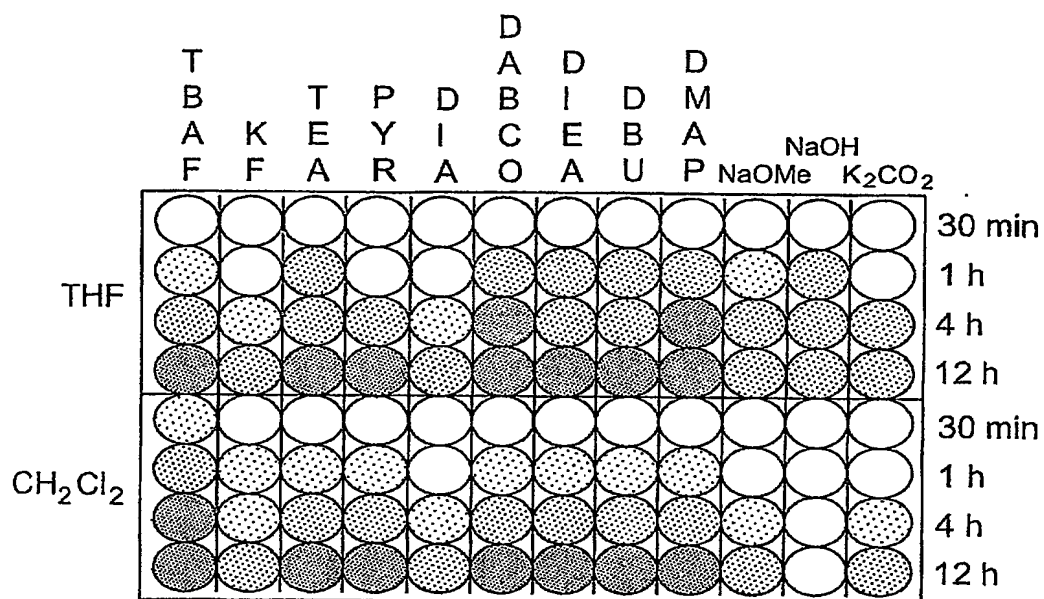


FIG. 2

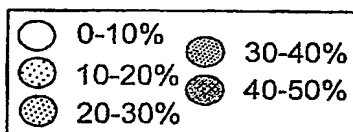
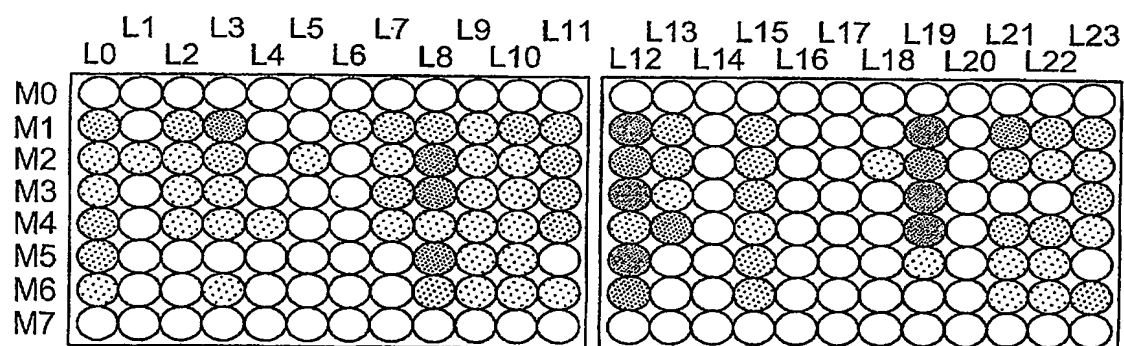


FIG. 4

3 / 3

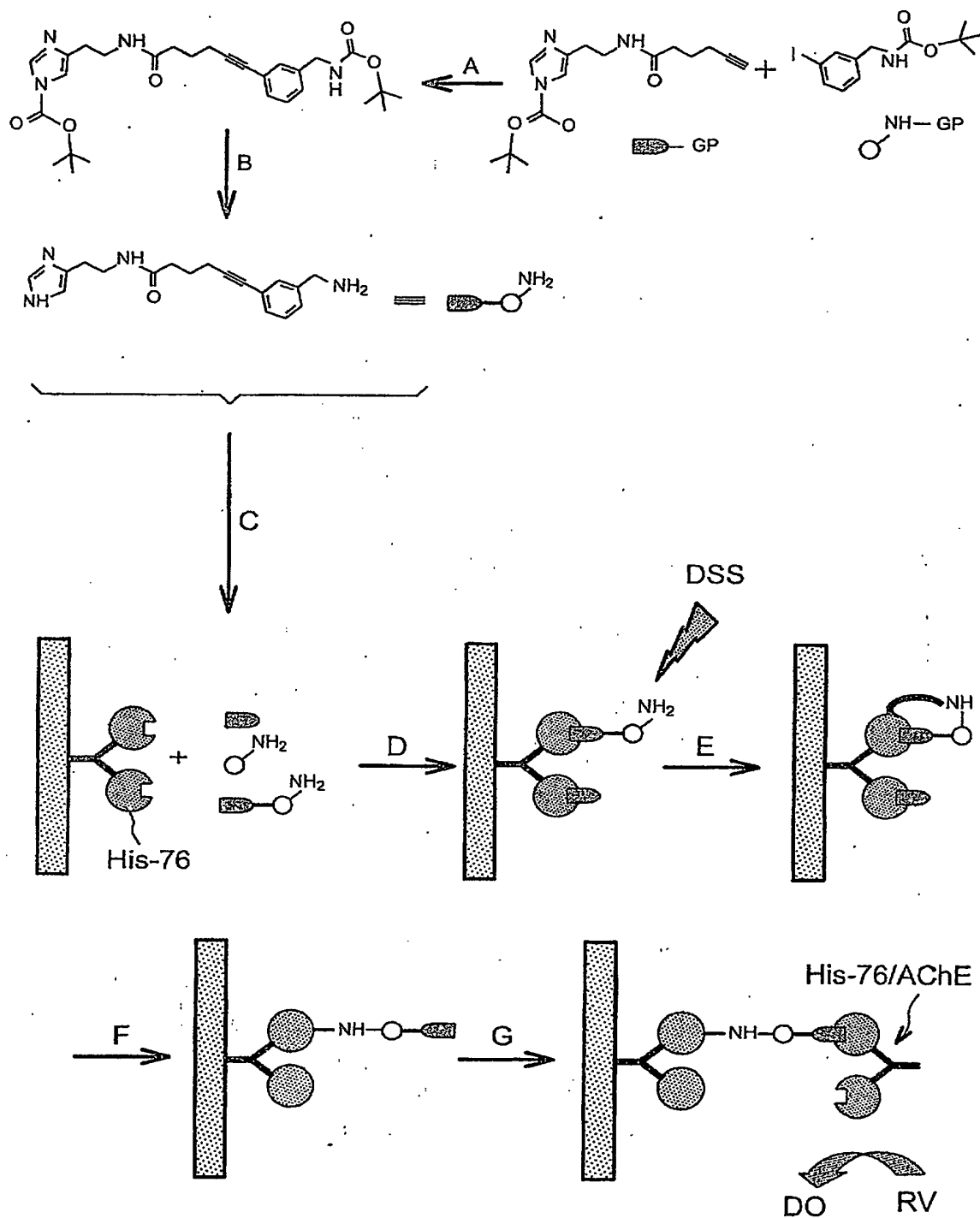


FIG. 3



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



## DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et  
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		B14076.3/SLDEPOT ELECTRONIQUE
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		03.50106 DU 15.04.2003
<b>TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> PROCEDURE DE CIBLAGE DE CONDITIONS OPERATOIRES D'UNE REACTION CHIMIQUE DE COUPLAGE ET TROUSSES POUR LA MISE EN OEUVRE DE CE PROCEDURE.		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31-33 rue de la Fédération 75752 PARIS 15 ème.		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b> Nom		TARAN
Prénoms		Frédéric
Adresse	Rue	7 Allée du Pré Clair
	Code postal et ville	91190 GIF SUR YVETTE
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b> Nom		CREMINON
Prénoms		Christophe
Adresse	Rue	30, avenue Saint Laurent Bâtiment C2
	Code postal et ville	91400 ORSAY
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b> Nom		RENARD
Prénoms		Pierre-Yves
Adresse	Rue	30 rue de Rivoli
	Code postal et ville	75004 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>  PARIS LE 24 JUIN 2003 S. LENOIR 